



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO OZÔNIO NO PROCESSAMENTO DA
TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758)**

ANDRESSA MEDEIROS DE MENDONÇA SILVA

MOSSORÓ / RN - BRASIL

AGOSTO/2015

ANDRESSA MEDEIROS DE MENDONÇA SILVA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO OZÔNIO NO
PROCESSAMENTO DA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis
niloticus* (LINNAEUS, 1758)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alex Augusto Gonçalves

MOSSORÓ – RN – BRASIL

Agosto – 2015

Catálogo na Fonte

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Silva, Andressa Medeiros de Mendonça.

Efeito antimicrobiano do ozônio no processamento da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 / Andressa Medeiros de Mendonça Silva. - Mossoró, 2015.

73f: il.

1. Pescado. 2. Água ozonizada. 3. Segurança alimentar. 4. Tilápia do nilo. 5. Agente oxidante. I. Título

RN/UFRSA/BCOT/447

CDD 639.2 S586e

ANDRESSA MEDEIROS DE MENDONÇA SILVA

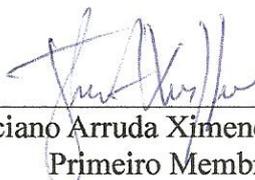
**EFEITO ANTIMICROBIANO DO OZÔNIO NO
PROCESSAMENTO DA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis
niloticus* (LINNAEUS, 1758)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM 28/08/2015

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Alex Augusto Gonçalves (UFERSA)
Orientador


Prof. Dr. José Ticiano Arruda Ximenes de Lima (UFERSA)
Primeiro Membro


Prof. Dr. Raquel Lima Salgado (UFERSA)
Segundo Membro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Andressa Medeiros de Mendonça Silva – nascida em Mossoró – RN, no dia 07 de setembro de 1988. Concluiu o Ensino Fundamental na Escola Dinâmica de Ensino Moderno em 2003, e o Ensino Médio no Colégio Geo Garcia & Brito em 2006. Ingressou, em 2007, no curso de graduação em Engenharia de Pesca na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Em 2013 concluiu a graduação com o TCC intitulado: Avaliação da Biossegurança na fase de engorda no cultivo de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*). Em agosto de 2013 participou da seleção para ingresso no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da UFERSA, sendo aprovada e matriculada no mesmo ano.

“Talvez não tenha conseguido fazer
o melhor, mas lutei para que o
melhor fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas Graças a Deus, não
sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À Deus que me dá forças e determinação para atingir meus objetivos e meu anjo da guarda pela valiosa proteção. Por todas as pessoas que o Senhor me enviou e que me ensinaram muito no decorrer da minha caminhada. Obrigada por me ajudar sempre, por ser meu amigo mais fiel, por todas as alegrias que tive, que tenho e que ainda terei. Agradeço por todas as curas, por todas as minhas superações e por tantas barreiras consideradas indestrutíveis que o Senhor me ajudou a superá-las.

Ao meu orientador, Drº Alex Augusto Gonçalves por toda paciência, ensinamentos, confiança, compreensão, disponibilidade, orientação dedicada e por toda contribuição ao longo desta pesquisa.

À minha mãe, Elizabeth Regina, meu maior exemplo, que sempre me apoiou, me incentivou e me ajudou de todas as maneiras possíveis para a realização desse sonho, pelo investimento que fez em mim, pela confiança, oportunidade, pelo amor incondicional, pelo carinho e exemplo de pessoa honesta que é. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto.

Aos meus irmãos, Vanessa e Alysson, que sempre torceram por mim para a concretização deste meu sonho, por ser meu porto de abrigo, meu apoio, companheiros da vida toda. Muito obrigada.

Agradeço de forma especial a Lucas Rebouças que participou diretamente deste trabalho. Amigo fiel que esteve ao meu lado em momentos cruciais da elaboração dessa dissertação e pela incrível disponibilidade oferecida. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. Foi bom poder contar com você.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia e Controle de Qualidade do Pescado (LAPESC) que contribuíram para a realização desse trabalho Sinthya, Odonil, Bárbara, Tanyla, Lyzandra, e em especial a Thyciana por estar presente e disposta a ajudar em tudo. Obrigada a todos!

Ao pessoal do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), Carol e Jean pelo auxílio nas análises microbiológicas e disponibilidade do laboratório.

À Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) por gerar oportunidades aos alunos do semiárido potiguar formando grandes profissionais.

Às minhas amigas Nathália, Cibelle, Ana Luíza, Dannielly, Ramaiane, Mayra, Mariana, Eudilena pela amizade, confiança e apoio nas horas precisas e nos momentos de estresse.

À Associação dos Aquicultores do Apodi.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro como agente financiador da bolsa do mestrado.

Agradeço aos meus familiares que acreditaram em mim e me ajudaram no que foi preciso.

E a todos, que de alguma forma, participaram deste trabalho através do compartilhamento do conhecimento, pela troca de experiências e pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

EFEITO ANTIMICROBIANO DO OZÔNIO NO PROCESSAMENTO DA TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758).

SILVA, Andressa Medeiros de Mendonça. **Efeito antimicrobiano do ozônio no processamento da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).** 2015. 74f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

RESUMO: O objetivo com o presente trabalho foi avaliar a eficiência da água ozonizada como agente antimicrobiano no processamento da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Amostras de tilápia inteira e filés foram imersas em água gelada (11°C) sem ozônio (0 ppm - controle) e com ozônio (0,5; 1,0; 1,5 ppm) durante 0; 5; 10; e 15 minutos. Parâmetros microbiológicos (contagem total de mesófilos, contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, coliformes termotolerantes e presença de *Salmonella sp.*) e físico-químicos (pH, cor, TBA) foram avaliados a fim de verificar diminuição da carga microbiológica e possíveis alterações de pH, cor do filé, e oxidação lipídica (TBA). A concentração de ozônio mais efetiva sobre a diminuição da carga microbiana da superfície da tilápia foi a de 1,5 ppm, reduzindo as populações iniciais de bactérias mesófilas em 91,78%. Nesta concentração (1,5 ppm), a eficácia foi nos primeiros 5 min., reduzindo a carga microbiana em 71,23%. Na imersão do filé, a concentração de ozônio de 1,5 ppm também apresentou a maior redução de bactérias mesófilas 70,19%. O tratamento dos filés com água ozonizada não demonstrou influência sobre o pH e cor dos filés, no entanto, observou-se um aumento dos valores de TBA (1,5 ppm de O₃ por 15 min.), demonstrando que ocorreu oxidação lipídica, mas inferior aos limites que os deixam impróprios para o consumo. Os resultados demonstraram que a água ozonizada foi eficiente na redução da carga microbiana do pescado durante o processamento. O custo do consumo de energia elétrica utilizada para geração do ozônio demonstrou sua viabilidade de uso.

Palavras-chave: Agente Oxidante; Água ozonizada; Pescado; Qualidade; Segurança alimentar.

ANTIMICROBIAL EFFECT OF OZONE IN THE NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) PROCESSING

SILVA, Andressa Medeiros de Mendonça. **Antimicrobial effect of ozone in the Nile tilapia, *oreochromis niloticus* (linnaeus, 1758) processing.** 2015. 74f. Dissertation (MSc in Animal Production) - Federal Rural University of Semi-Arid (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the efficiency of ozonated water as an antimicrobial agent in the Nile tilapia (*O. niloticus*) processing. Samples of whole tilapia and fillets were washed with cold water (11 ° C), without ozone (0 ppm - control) and with ozone (0.5; 1.0; 1.5 ppm) for 0; 5; 10; and 15 minutes. Microbiological parameters (total count of mesophilic, *Staphylococcus aureus* positive coagulase counts, fecal coliforms and the presence of *Salmonella* sp.) and physicochemical parameters (pH, color, TBA) were evaluated in order to check the microbiological load reduction and possible changes on pH, color and lipid oxidation (TBA) of fillets. The most effective ozone concentration on reducing the microbial load of the surface of tilapia was 1.5 ppm, reducing the initial populations of mesophilic bacteria in 91.78%. At this concentration (1.5 ppm), it was effective within the first 5 min., reducing the microbial load of 71.23%. In fillet washing, 1.5 ppm ozone concentration also showed the greatest reduction of mesophilic bacteria 70.19%. The treatment with ozonated water of fillets showed no influence on the pH and color of the fillets, however, there was an increase in the TBA value (1.5 ppm of O₃ for 15 min.), showing that lipid oxidation occurred, but below the thresholds that make them unfit for consumption. The results showed that the ozonated water has been effective in reducing the microbial load of the fish during processing. The cost of electricity consumption used for ozone generation demonstrated its feasibility of use.

Keywords: Oxidant agent; Ozonized water; Seafood; Quality; Food Safety.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: História da aplicação do ozônio na indústria do pescado.....	20
Tabela 2: Agentes oxidantes e seu potencial de oxidação.....	24
Tabela 3: Relação da temperatura e solubilidade do ozônio na água.....	24
Tabela 4: Eficácia da aplicação do ozônio na redução da população bacteriana.	26
Tabela 5: Aplicação do ozônio na indústria do pescado – concentração e tempo de contato do ozônio (O ₃) com o pescado.....	28
Tabela 6: Fatores Concentração e Tempo no esquema fatorial 4x4.....	33
Tabela 7: Concentração de ozônio na água (n= 3)	40
Tabela 8: Custo com energia elétrica do gerador de ozônio.....	40
Tabela 9: Efeito do gelo na redução microbiana (Contagem Total de Mesófilos - Log ₁₀ UFC/cm ²) - <i>Swab</i> de superfície.	41
Tabela 10: Valores médios de pH, cor e TBA em filés de tilápia do Nilo lavadas com água sem ozônio (Controle) e com água ozonizada (0,5; 1,0 e 1,5 ppm) durante 0; 5; 10 e 15 minutos.	49
Tabela 11: Parâmetro de cor “L*” (Luminosidade) nos filés de tilápia do Nilo lavadas com água ozonizada nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm durante 0; 5; 10 e 15 minutos de imersão.	52
Tabela 12: Parâmetro de cor “a” (Vermelho (+a) e Verde (-a)) nos filés de tilápia do Nilo lavadas com água ozonizada nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm durante 0; 5; 10 e 15 minutos de imersão.....	53
Tabela 13: Parâmetro de cor “b” (Amarelo (+b) – Azul (-b)) nos filés de tilápia do Nilo lavadas com água ozonizada nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm durante 0; 5; 10 e 15 minutos de imersão.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tilápia-do-Nilo	16
Figura 2. Síntese de ozônio pelo método de descarga elétrica	22
Figura 3. Estrutura do ozônio	23
Figura 4. Esquema do sistema de geração de ozônio e produção de água ozonizada para testes de simulando planta industrial	34
Figura 5. Fluxograma do processo de lavagem com água (0 ppm) e com água ozonizada (0,5; 1,0; 1,5 ppm).....	35
Figura 6. Fluxograma do processo de lavagem do filé com água (0 ppm) e com água ozonizada (0,5; 1,0; 1,5 ppm).....	36
Figura 7. Determinação da cor do filé de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	38
Figura 8. Efeito da água ozonizada na redução microbiana (Contagem Total de Mesófilos - Log10 UFC/cm ²) da superfície da tilápia do Nilo - Swab de Superfície.....	44
Figura 9. Efeito da água ozonizada na redução microbiana (Contagem Total de Mesófilos – Log10 UFC/g) nos filés de tilápia do Nilo.	46
Figura 10. Variação de pH nos filés de tilápia do Nilo imersas em água ozonizada (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm) durante 0; 5; 10 e 15 minutos. Erro! Indicador não definido.	
Figura 11. Variação de TBA nos filés de tilápia do Nilo imersas em água ozonizada (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm) durante 0; 5; 10 e 15 minutos.....	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 CARACTERÍSTICAS DA TILÁPIA-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	16
2.2 QUALIDADE E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO PESCADO DURANTE O PROCESSAMENTO.	17
2.3 A HISTÓRIA DO OZÔNIO	19
2.4 PROCESSO DE GERAÇÃO DO OZÔNIO	21
2.5 PROPRIEDADES DO OZÔNIO	22
2.6 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO OZÔNIO NA ÁGUA	25
2.7 OZÔNIO NO PROCESSAMENTO DO PESCADO	26
2.9 PADRÕES FÍSICO-QUÍMICOS PARA A GARANTIA DA QUALIDADE DO PESCADO FRESCO	28
2.9.1 O potencial hidrogeniônico (pH)	28
2.9.2 Análise da Cor Colorimetria	29
2.9.3 Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA)	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.2 AQUISIÇÃO E TRANSPORTE DA MATÉRIA-PRIMA	33
4.3 OBTENÇÃO DA ÁGUA OZONIZADA	33
4.4 MENSURAÇÃO DO OZÔNIO RESIDUAL EM ÁGUA	34
4.5 EXPERIMENTOS	35
4.5.1 Efeito da água ozonizada sobre a carga microbiana da tilápia inteira	35
4.5.2 Efeito da água ozonizada no processamento de filetagem da tilápia do Nilo	35
4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	37
4.7 MEDIÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)	37
4.8 ANÁLISE DA COR	38
4.9 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA ATRAVÉS DO TESTE DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA)	38
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 MENSURAÇÃO DO OZÔNIO RESIDUAL EM ÁGUA	40
5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	41

5.2.1 Efeito do resfriamento em gelo sobre a carga microbiana da tilápia do Nilo inteira.....	41
5.2.2 Efeito da água ozonizada sobre a carga microbiana da tilápia do Nilo inteira.....	43
5.2.3 Efeito da água ozonizada no processamento de filetagem da tilápia do Nilo.....	46
5.3 FÍSICO-QUÍMICO.....	48
5.3.1 pH.....	50
5.3.2 Cor.....	51
5.3.3 Teste do TBA.....	55
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO A.....	71
ANEXO B.....	73

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma das atividades que mais se desenvolveu no Brasil nos últimos anos, devido ao seu clima favorável e a grande extensão de recursos hídricos existentes no País, e uma das espécies que apresenta destaque econômico atualmente é a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (BRITO *et al.*, 2014). De 2003 a 2011, a produção de tilápia no Brasil subiu de 64.857,5 toneladas para 253.824,1 toneladas, um aumento de 29,1% (MPA, 2012).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais importantes na produção mundial, devido a sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições de criação, além de boa aceitação pelo consumidor, principalmente pela excelente textura, sabor de sua carne e ausência de espinhas intramusculares (ALVES *et al.*, 2010).

No entanto, em virtude de sua composição química específica (potencial hidrogênio iônico, atividade de água, nutrientes, estrutura muscular frágil e tecido conjuntivo frouxo), tem sido evidenciado que a contaminação e deterioração do pescado, ocorrem mais facilmente que nas carnes de aves e mamíferos (CARVALHO FILHO, 2009). Logo que o peixe é retirado da água, ocorre uma série de alterações bioquímicas que culminam com sua deterioração. Essas alterações se iniciam pela ação autolítica de enzimas musculares, que hidrolisam proteínas e gorduras, seguidas pela ação de microrganismos, que provocam alterações químicas e físicas profunda resultando em odor e sabor desagradáveis (MONTEIRO, 2011).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorrem em virtude da falta de cuidados higiênico-sanitários e controle do pescado desde a aquisição da matéria prima até a manipulação e processamento, desta forma, o padrão microbiológico é de suma importância na segurança alimentar, e vem sendo desenvolvidas uma série de pesquisas para o desenvolvimento de métodos que aumentem a vida de prateleira e conseqüentemente a segurança dos alimentos (SOARES *et al.*, 2012).

Existem vários métodos utilizados para a redução da carga microbiana do pescado, dentre eles estão o uso do cloro, ultrassom e recentemente a tecnologia do ozônio que podem estar associados ou não a outros métodos (OLIVEIRA *et al.*, 2008). O ozônio é um dos mais potentes oxidantes que se conhece para utilização como bactericida, apresentando inúmeras

vantagens, entre elas destaca-se a eficiência como desinfetante, além de ser um poderoso germicida que atua na destruição da classe dos fungos e bactérias, impossibilitando a proliferação desses organismos. O ozônio também possui a vantagem de reagir com a matéria orgânica, sem formação de qualquer subproduto tóxico (GONÇALVES, 2009; 2011).

Essas propriedades intrínsecas permitem a ingestão de alimentos ozonizados sem riscos à saúde, constituindo-se em excelente alternativa para substituir o cloro e o peróxido de hidrogênio, os quais são os principais sanitizantes relacionados como produtos tóxicos (CHIATTONE *et al.*, 2008). O ozônio não é universalmente benéfico e em alguns casos pode promover deterioração oxidativa em alimentos (uma vez que ao final do processo de ozonização ocorre um aumento da concentração de oxigênio), principalmente quando apresentam alto teor lipídico. Superfície oxidada, descoloração, ou até mesmo o desenvolvimento de odores indesejáveis podem ocorrer em substratos, tais como carne, em decorrência do uso excessivo de ozônio (MANOUSARIDIS *et al.*, 2005).

O ozônio é aprovado nos Estados Unidos como "Geralmente Reconhecido como Seguro" (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) para o tratamento de água engarrafada. Recentemente, os Estados Unidos afirmaram o ozônio como substância GRAS para aplicações em alimentos (FLICK, 2004). Em 21 de dezembro de 2001, o Departamento de Segurança Alimentar e Serviço de Inspeção de Agricultura (USDA / SISA) aprovou o uso do ozônio em contato com carnes e aves, a partir de matéria-prima até os produtos cozidos e fresco poucos apenas antes da embalagem. Além de desinfecção contato direto dos alimentos, o ozônio também pode ser aplicado a equipamentos de processamento de alimentos e superfícies de contato não-alimentares (RICE *et al.* 2014).

Nesse contexto, objetivou-se no presente trabalho avaliar a eficiência antimicrobiana do ozônio no processamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia, *Oreochromis spp.*, pertencente à família Cichlidae, e que compõe o grupo de peixes que mais cresce em termos de comercialização mundial. É o segundo grupo mais produzido mundialmente, e apesar das imprecisões estatísticas, estima-se ser o gênero mais produzido no Brasil (SANTOS, 2013).

A tilápia-do-Nilo (Figura 1) foi introduzida nos diferentes continentes e, atualmente, se encontram em criações comerciais de quase 100 países (ZANOLO & YAMAMURA, 2006). São peixes originários da África, mais especificamente do Rio Nilo, que foram introduzidos no Brasil na metade do século XX (SOARES, 2012). Esta espécie foi introduzida nos países das regiões tropicais e subtropicais, tanto para melhorar a produtividade pesqueira como para auxiliar o desenvolvimento da aquicultura (CORREIA *et al.*, 2006). É uma espécie de destaque no cenário da piscicultura nacional. 80% da produção de peixes no Brasil está concentrada na produção de tilápia, carpa, tambaqui e pacu (SOARES, 2012).



Figura 1. Tilápia-do-Nilo (Fonte: Arquivo Pessoal).

A produção de tilápia no Brasil apresenta um padrão de crescimento contínuo desde 1994. Entre os anos de 2003 a 2009, a produção de tilápia cresceu 105% em apenas sete anos, saindo de 64.857,5 t. para 132.957,8 t. Os maiores aumentos de produção foram em 2002,

quando houve um acréscimo de 59% em relação a 2001 e, em 2007, quando a produção aumentou 85%, chegando a ultrapassar 130 mil t. Do ano de 2007 para 2008 houve um crescimento de 17%, saindo de 95.0910 t. para 111.145,3 t. do ano de 2008 para 2009 houve um crescimento de 20% da produção, chegando a 132.957,8 t. (MPA, 2011).

A tilápia caracteriza-se pela coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas. O rastro branquial do primeiro arco branquial tem de 16 a 26 espinhos o que classifica como uma espécie filtradora de plâncton, naturalmente é macrófago, porém em presença de excesso de alimento comporta-se como onívora. Não é exigente quanto ao oxigênio e vive bem em água salobras, com salinidade de até 18% (VIDAL, 2007).

Com boa aceitação no mercado consumidor, destacando-se em cultivos, por apresentar crescimento rápido, rusticidade, carne de ótima qualidade, e por não apresentar espinhos na forma de “Y” no seu filé, é apropriada para a filetagem, tornando-se de grande interesse para a piscicultura (SANTOS *et al.*, 2008). Além disso, características como a carne branca de textura firme, sabor delicado, facilidade na filetagem e por não possuir odor desagradável fazem com que esta espécie seja uma das mais preferidas pelos consumidores (SOARES *et al.*, 2014). A tilápia é uma das espécies de peixe mais comercializada na forma de filé, apresentando um rendimento em filé de aproximadamente 33% (VIDAL, 2007).

Além do filé, podem ser comercializados outros produtos de tilápia como hambúrgueres, nuggets, empanados, espetinhos, petiscos, sashimi e farinha de tilápia. Do seu couro podem ser feitos diversos acessórios como bolsas, sapatos e cintos. Algumas cadeias de supermercado passaram a comercializar o peixe (inclusive alguns estabelecimentos com ele ainda vivo), o que revela a sua aceitação pelo consumidor brasileiro (JÚNIOR & JÚNIOR, 2008).

2.2 QUALIDADE E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO PESCADO DURANTE O PROCESSAMENTO.

Atualmente o consumidor tem-se tornado mais exigente, e as indústrias vêm buscando atender a essa nova realidade, investindo na qualidade de seus produtos. Essa qualidade deverá assegurar ao consumidor produtos que satisfaçam suas necessidades e, ao mesmo tempo, sejam seguros (RIBEIRO *et al.*, 2009). A preocupação com a qualidade dos alimentos

é um desafio crescente, em especial ao que se refere à segurança do produto, pois ao ocorrer qualquer problema pode comprometer a saúde do consumidor (LIMA, 2012).

O pescado é um alimento altamente perecível, exigindo cuidados com seu manuseio e processamento, desde a captura até a chegada à mesa do consumidor. Geralmente chega ao consumidor com carga microbiana elevada, composta por microrganismos tanto deteriorantes como patogênicos (SOARES *et al.*, 2011). Isto porque, a sua carne deteriora-se facilmente por autólise, atividades microbianas e/ou oxidação, devido suas características fisiológicas e composição química (SOARES *et al.*, 2011; LIMA, 2012). Este pode ser também um produto de alto risco para a saúde, se estiver contaminado por microrganismos patogênicos (LIMA, 2012).

A presença desses microrganismos evidencia deficiências em algumas etapas do processamento ou na conservação do produto final, que comprometem a qualidade e o grau de frescor, podendo causar sérios danos à saúde do consumidor, que vão desde uma simples intoxicação até a morte (RIBEIRO *et al.*, 2009).

O manuseio na linha de processamento e a conservação incorretamente aplicada durante a captura e comercialização representam os principais problemas para manter a qualidade do pescado (GOMES, 2006). Outro fator que corrobora para a ocorrência da contaminação é a deficiência no processo de sanitização dos equipamentos e utensílios utilizados nas diversas etapas do processamento (SOUSA *et al.*, 2011).

O pescado pode ser também, veiculador de vários microrganismos patogênicos para o homem, a maior parte deles, pela contaminação ambiental (lançamentos dos esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e mar) e/ou manipulação inadequada. (DAMASCENO, 2009). Portanto, devemos adotar todas as precauções pertinentes, a fim de evitar que esses alimentos não sirvam de via de transmissão de doenças aos seus consumidores (GOMES, 2006).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) constituem um grupo de enfermidades, na qual o alimento contaminado é o mais importante veículo do agente patogênico. A transmissão de agentes patogênicos pelo pescado tem sido relatada frequentemente (VALLANDRO, 2010), representando um importante problema de saúde pública por acometer milhões de pessoas em todo o mundo (SOARES, 2012).

As bactérias de maior preocupação em peixes e produtos são as formas patogênicas de: *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella ssp.*, *Shigella ssp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringes*, *Bacillus cereus*, *Compylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*. Estes gêneros e espécies, mesmo que presentes em níveis baixos merecem consideração, porque em alguns casos uma dose infectante baixa é suficiente para provocar sérios problemas para saúde pública (LIMA, 2012).

A segurança e a qualidade dos produtos alimentares são tópicos importantes da atualidade, o que é evidenciado pelo crescente número de leis que exigem a qualidade dos alimentos nas várias etapas da cadeia de produção (SOARES & GONÇALVES, 2012).

A RDC 12/01 da ANVISA, que aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, define os padrões microbiológicos para peixe *in natura* (resfriados ou congelados), as únicas análises preconizadas se referem à enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva* – $10^3/g$ de amostra e pesquisa de *Salmonella spp.* por 25g de amostra, sendo o limite estabelecido na legislação sua ausência em 25g (BRASIL, 2001).

A legislação sanitária ao impor limites à presença de microrganismos, patogênicos ou deterioradores nos pescados, garante a segurança alimentar e a qualidade em seu consumo (DÓRIA, 2012).

2.3 A HISTÓRIA DO OZÔNIO

O ozônio foi descoberto pela primeira vez em 1839 por Schönbein, estudando a decomposição eletrolítica da água (TIWARI & RICE, 2012). Somente após duas décadas de sua descoberta ficou claramente identificada a composição triatômica do ozônio, contendo apenas oxigênio (GONÇALVES, 2003).

A ação germicida do ozônio foi evidenciada na França, no final do século XIX, onde começou a ser utilizado como desinfetante em Estações de Tratamento de Água (ETA) (GONÇALVES, 2003; GONÇALVES & KECHINSKI, 2011; SILVA *et al.*, 2011). Desde então, tem sido estudado e aplicado extensivamente como oxidante e desinfetante em tratamento de águas superficiais para a produção de água potável na Europa e está cada vez mais, sendo aplicado como pré-oxidante nos Estados Unidos (MONDARDO *et al.*, 2006).

Apenas nos anos 90, os Estados Unidos afirmaram o ozônio como uma substância GRAS para aplicação direta em produtos alimentícios (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004), e em 2001, foi declarado seguro como aditivo secundário para o uso em alimentos (PEZZI, 2009).

Na indústria de processamento de alimentos, o ozônio tem sido utilizado como o ozônio gasoso e dissolvido em água (água ozonizada). Ambos têm sido utilizados como um bactericida em uma vasta gama de produtos alimentares, incluindo carne, aves, ovos, frutas e vegetais crus, frutos e sumos de frutos, bem como o saneamento de superfícies de contato com o produto (CHAWLA, 2006; GONÇALVES & KECHINSKI, 2011).

O ozônio tem sido estudado para estender a vida útil de prateleira de muitos alimentos perecíveis retardando a decomposição causada por microrganismos (SILVA *et al.*, 2011). Atualmente, ele é utilizado sem restrições em indústrias de alimentos nos Estados Unidos. No Brasil, entretanto, a aplicação do ozônio com essa finalidade ainda é limitada, não havendo, até o momento, uma legislação específica para o seu uso em alimentos (CHIATTONE *et al.*, 2008). Na indústria de pescado, o ozônio já está sendo utilizado, e tem sido promissor, apesar de uma maneira predominantemente experimental e pouco documentado (GONÇALVES, 2011). Cronologicamente, a história da aplicação do ozônio na indústria do pescado pode ser resumida de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: História da aplicação do ozônio na indústria do pescado.

ANO	PAÍS	APLICAÇÃO
1936	França	Vida de prateleira de peixe estocado em gelo O ₃ .
1969	Japão	Vida de prateleira cavala (<i>T. trachurus</i>) imerso água O ₃ .
1984	México	Vida de prateleira camarão em gelo O ₃ .
1987	China	Efeito desinfetante da água O ₃ na indústria.
1987	USA	Vida de prateleira do bacalhau do atlântico (água O ₃ gelo O ₃).
1990	USA	Água O ₃ e gelo O ₃ no processamento catfish.
1992	China	Efeito desinfetante da água O ₃ no processamento do camarão.
1996	UK	Vida de prateleira bacalhau e cavala com gelo O ₃ .
1997	UK	Vida de prateleira bacalhau e cavala com água O ₃ vs. clorada.
1997	Alemanha	Vida de prateleira de <i>rockfish</i> (<i>Sebastes sp.</i>) água O ₃ .
1998	UK	Vida de prateleira cavala (<i>trachurus trachurus</i>) câmara com O ₃
1999	USA	Vida de prateleira atum fresco (água O ₃) e embalada a vácuo.
2000	USA	Vida de prateleira e qualidade <i>catfish</i> água O ₃ .
2001	USA	FDA reconhece como aditivo secundário para alimentos. <i>Food Safety and Inspection Service</i> (FSIS) declarou aceitável em produtos cárneos e avícolas
2001	Espanha	Depuração de Ostras com ozônio
2002	USA	Redução de microrganismos do peixe e equipamento com água O ₃ .

2005	Grécia	Vida de prateleira mexilhão em água O ₃ e embalado a vácuo.
2005	Israel	Pré-tratamento com água O ₃ em tilápia + estocagem.
2005	Espanha	Vida de prateleira sardinha em gelo líquido O ₃
2006	Portugal	Inativação de <i>Listeria innocua</i> em truta defumada.
2006	USA	Tratamento do camarão com água O ₃
2007	USA	Tratamento camarão com água O ₃
2008	Turquia	Peixe de água doce (<i>Capoeta capoeta</i>) em gelo O ₃
2008	Espanha	Vida de prateleira linguado em água O ₃ e gelo O ₃
2008	Espanha	Vida de prateleira merluza em água O ₃ e gelo O ₃
2010	China	Vida de prateleira da ostra em água O ₃
2010	Brasil	Vida de prateleira pescada Goete (<i>Scianidae</i>)
2011	USA	Avaliação do desempenho da Truta-arco-íris na água O ₃
2012	USA	Segurança microbiana do filé de salmão com sprays água O ₃ .
2012	Itália	Uso do O ₃ e embalagem em atm. modif. no Salmonete listrado.
2013	China	Inativação de <i>Listeria innocua</i> em camarão com água O ₃ .
2013	Brasil	Controle de <i>Salmonella enterica Typhimurium</i> e vida de prateleira dos filés de cauda de Jacaré com água O ₃ .
2014	China	Vida de prateleira da ostra em água O ₃ .
2014	Emirados Árabes Unidos	Qualidade do camarão (<i>Litopenaeus vannamei</i>) em água O ₃ .

Fonte: Adaptado de Gonçalves (2011)

2.4 PROCESSO DE GERAÇÃO DO OZÔNIO

O ozônio é encontrado em forma natural na atmosfera, ou pode ser produzida por geradores (KIM, 2012). Devido à instabilidade do ozônio, na fase gasosa, o que impede sua armazenagem, torna-se necessária sua geração *in situ* (SUMMERFELT & HOCHHEIMER, 1997; USEPA, 1999). Ozônio pode ser produzido por três diferentes técnicas: exposição do O₂ à luz ultravioleta, eletrólise do ácido perclórico e descarga elétrica.

A técnica mais importante comercialmente é por descarga elétrica, conhecida como efeito corona, pois gera uma quantidade maior de ozônio com menor custo (GRAHAM, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004; CHAWLA, 2006; SILVA *et al.*, 2011). Nesse método, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos, um de alta tensão e outro de baixa tensão, submetidos a uma elevada diferença de potencial elétrico de, aproximadamente, 10.000 V (SUMMERFELT & HOCHHEIMER, 1997; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; KASIVISWANATHAN *et al.*, 2010; GONÇALVES & KECHINSKI, 2011; COSTA, 2012). Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de oxigênio, começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do oxigênio e a consequente formação do ozônio (USEPA, 1999; KASIVISWANATHAN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*,

2011; GONÇALVES & KECHINSKI, 2011). Nesse método, a produção de ozônio varia dependendo da diferença de potencial, da frequência da corrente elétrica, da constante dielétrica e do espaço de separação entre os eletrodos (CHAWLA, 2006).

Na Figura 2, pode-se observar um esquema da geração de ozônio pelo processo corona. As vantagens da descarga eletroquímica por efeito corona são: alta concentração de ozônio, melhores aplicações em água, equipamento pode durar anos sem manutenção (GONÇALVES, 2009). O processo corona pode converter oxigênio molecular em ozônio a concentrações de até 4% em massa para geração a partir de ar e de até 14% para geração a partir do oxigênio puro (GRAHAM, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2004; GONÇALVES & PAIVA, 2004; GONÇALVES 2009; SILVA *et al.*, 2011).

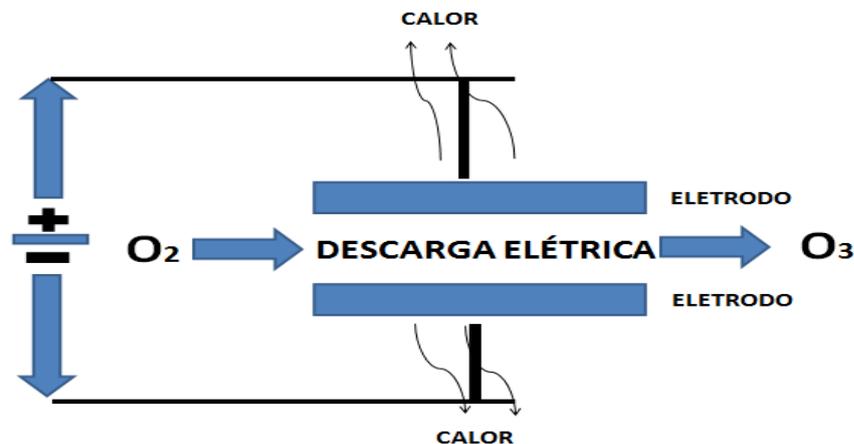


Figura 2. Síntese de ozônio pelo método de descarga elétrica (SILVA *et al.*, 2011).

2.5 PROPRIEDADES DO OZÔNIO

O ozônio (O_3) é uma forma triatômica do oxigênio, sendo um gás extremamente instável. O gás ozônio possui um odor repugnante e é facilmente detectável pelos sentidos olfativos humanos em baixos níveis de 0,01ppm para 0,02 ppm (GRAHAM, 2000; DEW, 2005). Uma exposição de uma hora a concentrações de 2, 4, 15 e 95 mg/L pode causar efeitos sintomáticos, irritantes, tóxicos e letais, respectivamente (SILVA *et al.*, 2011).

O ozônio é altamente corrosivo no equipamento e letal para os seres humanos, com uma exposição prolongada, em concentrações acima de 4 ppm (SUSLOW, 2003). O gás de ozônio decompõe-se rapidamente em oxigênio (O_2) (KASIVISWANATHAN *et al.*, 2010). Sua velocidade de decomposição é fortemente dependente da pureza do solvente, diminuindo

na presença de impurezas. Condensa-se a $-112,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e congela a $-193\text{ }^{\circ}\text{C}$. O ozônio em estado líquida pode explodir facilmente por motivos de choques, faísca elétrica ou mudanças bruscas na temperatura e pressão (COSTA, 2012). A figura 3 apresenta a forma da estrutura molecular do ozônio.

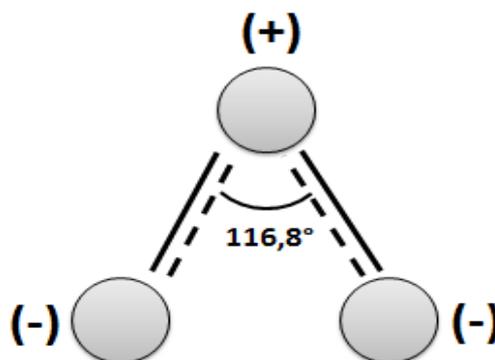


Figura 3. Estrutura do ozônio (PERANI, 2010).

O ozônio é considerado um dos oxidantes mais poderosos que se conhece, possuindo uma grande capacidade de desinfecção e esterilização, comparando com o cloro, e apresenta um menor tempo para realizar a desinfecção (USEPA, 1999; KHADRE *et al.*, 2001; GONÇALVES & PAIVA, 2004; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; GONÇALVES, 2009; GONÇALVES & KECHINSKI, 2011).

A primeira propriedade permite que o ozônio possa oxidar uma série de compostos inorgânicos e orgânicos (MAHMOUD & FREIRE, 2007). Ao ser comparado a outros agentes oxidantes (Tabela 2), o ozônio se destaca pelo elevado potencial de oxidação (2,07 mV). Dentre as substâncias químicas ordinárias, somente o flúor (3,06 mV) possui um potencial de redução maior que o ozônio (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; GONÇALVES, 2009; SILVA *et al.*, 2011; GONÇALVES & KECHINSKI, 2011).

À temperatura ambiente é um gás de coloração azulada, porém nas concentrações utilizadas com propósitos de desinfecção, torna-se incolor (CARDOSO *et al.*, 2003). A meia-vida de moléculas de ozônio no ar atmosférico é da ordem de 12 horas, em soluções aquáticas depende do conteúdo de matéria orgânica. O ozônio se dissolve na água dez vezes melhor do que o oxigênio e a sua solubilidade diminui com o aumento na temperatura da água (WYSOK *et al.*, 2006). Uma das principais características do ozônio é sua alta reatividade, apresentando tempo de meia-vida entre 15 e 50 min, sendo degradado em oxigênio, e dessa forma não apresenta nenhuma atividade residual ativa (COSTA, 2012).

Tabela 2: Agentes oxidantes e seu potencial de oxidação

Agente Oxidante	Potencial de Oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Bataller, Fernández & Véliz (2010).

O ozônio como um agente oxidante é 1,5 vezes mais forte do que o cloro e é eficaz ao longo de um espectro muito mais amplo de microrganismos que o cloro e outros desinfetantes (XU, 1999). A cloração produz nuvens de cloro e derivados de hidrocarbonetos nocivas (THMs) durante o tratamento, que são mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos em água, em alimentos ou em superfícies de contato (DEW, 2005; SILVA *et al.*, 2011). O ozônio, por outro lado não produz nuvens tóxicas e não há produtos secundários de hidrocarbonetos (DEW, 2005; ZHANG *et al.*, 2005).

O ozônio é parcialmente solúvel em água e, assim como a maioria dos gases, aumenta a sua solubilidade à medida que a temperatura decresce (Tabela 3) ou a mistura é pressurizada. Por esta razão, as concentrações de ozônio dissolvido geralmente não ultrapassam 5 ppm, uma vez que os tratamentos são efetuados sob condições atmosférica e temperatura próxima ao ambiente (PEZZI, 2009).

Tabela 3: Relação da temperatura e solubilidade do ozônio na água

Temperatura (°C)	Solubilidade (L ozônio /L água)
0	0.640
15	0.456
27	0.270
40	0.112
60	0.000

Fonte: Wysok *et al.* (2006)

A transferência do ozônio para a água inicia-se com a dispersão do gás na fase líquida, em forma de pequenas bolhas. Posteriormente, o ozônio é incorporado à massa líquida através

da interface gás-líquido (GONÇALVES, 2003). O diâmetro das bolhas introduzidas no sistema é um fator determinante para solubilização do ozônio, portanto, é considerado o diâmetro ideal das bolhas de ozônio é de 1 a 3 mm (KHADRE *et al.*, 2001).

2.6 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO OZÔNIO NA ÁGUA

O ozônio pode ser dissolvido em água e utilizado para desinfecção de alimentos e superfícies (COSTA, 2012). O ozônio é relativamente instável em solução aquosa e apresenta meia-vida que varia de 20 a 30 min em água destilada a 20°C (SILVA *et al.*, 2011). A lavagem com água ozonizada está ficando mais popular hoje em dia, devido à sua alta eficácia biocida e amplo espectro antimicrobiano (KIM, 2012). Quando o ozônio se decompõe em água, os radicais livres peróxido de hidrogênio (HO₂) e hidroxila (OH), que são formados têm uma grande capacidade de oxidação e desempenham um papel ativo no processo de desinfecção (USEPA, 1999). Assim, apresenta-se eficaz contra microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas e gram-positivas, bolores, leveduras, vírus, protozoários, inclusive formas esporuladas e cistos de protozoários, que são mais resistentes (ALEXANDRE *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

Devido a ser um poderoso agente oxidante, o ozônio pode ser usado para desinfecção na indústria alimentar (ZHANG *et al.*, 2005; CHAWLA, 2006). As propriedades bactericidas do ozônio têm sido demonstradas no caso de microrganismos Gram-positivos (*Listeria*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) e os microrganismos Gram-negativos (*Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*), em ambas esporos e células vegetativas (WYSOK *et al.*, 2006; GONÇALVES & KECHINSKI, 2011).

Geralmente, no que se refere à ação ao espectro microbiano cada microrganismo tem uma sensibilidade inerente ao ozônio. As bactérias são mais sensíveis do que as leveduras e os fungos. Bactérias Gram-positivas são mais sensíveis ao ozônio do que organismos Gram-negativos e os esporos são mais resistentes do que as células vegetativas (PATIL, 2010). A Tabela 4 apresenta os resultados de diversos experimentos que demonstram a eficácia do ozônio na redução da população bacteriana.

O mecanismo de destruição dos microrganismos é o que basicamente diferencia o ozônio de outros agentes. O cloro, especificamente, atua por difusão através da parede celular,

agindo sobre enzimas, proteínas, DNA e RNA. O ozônio, por apresentar uma capacidade de oxidação superior, age diretamente na parede da célula, causando sua ruptura e morte em menor tempo de contato, inviabilizando a recuperação dos microrganismos após o ataque (CHIATTONE *et al.*, 2008).

Tabela 4: Eficácia da aplicação do ozônio na redução da população bacteriana.

Bactéria	Condições do tratamento					
	Ozônio (mg/mL)	Tempo (min)	pH	Temperatura (°C)	Meio	% Redução
<i>Escherichia coli</i>	0,23-0,26	1,67	7	24	Ozônio na água em demanda livre	99,99
<i>Legionella pneumophila</i>	0,32-0,47	20	7	24	Destilada estéril	99,99
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	0,23-0,26	1,67	7	24	Ozônio na água em demanda livre	90,00
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,23-0,26	1,67	7	24	Ozônio na água em demanda livre	99,98
Estreptococos fecais	2,2	19	7,5	16	Efluente	99,60

Fonte: Silva *et al.* (2011)

Estudos têm mostrado a ação eficaz bactericida do ozônio para microrganismos dos alimentos (*P. aeruginosa* e *Z. bailii*), contaminantes fecais (*E. coli* e *E. faecalis*) e patógenos causadores de intoxicação alimentar (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. typhimurium*) (WYSOK *et al.*, 2006).

2.7 OZÔNIO NO PROCESSAMENTO DO PESCADO

Kim *et al.* (2000) avaliaram a eficiência da aplicação em meio aquoso do ozônio em solução salina sobre filés de peixes. Nesse estudo verificou-se que o tratamento com ozônio supriu o número inicial de coliformes totais e aeróbios psicrotóxicos, os resultados foram positivos, aumentando o tempo de vida-de-prateleira de 1,5 a 3 dias, com pequenas alterações na rancidez oxidativa e na cor. Para os files de peixe tratados com 10 ppm de ozônio ocorreu um aumento de 25% do tempo de vida-de-prateleira.

Campos *et al.* (2005) investigaram a eficiência do armazenamento de sardinha (*Sardina pilchardus*) através do uso de gelo líquido ozonizado, de gelo líquido e de gelo em escamas. As sardinhas armazenadas em gelo líquido ozonizado tiveram uma vida de prateleira de 19 dias, enquanto as sardinhas armazenadas em gelo líquido e em gelo em escamas apresentaram uma vida de prateleira de 15 e 8 dias respectivamente. As sardinhas

armazenadas em gelo líquido ozonizado apresentaram uma contagem mais baixa de microrganismos quando comparados com o gelo líquido e o gelo em escama.

Campos *et al.* (2006) investigaram a eficiência do ozônio no armazenamento do linguado (*Psetta maxima*). O armazenamento do pescado em 40% de gelo e 60% de água ozonizada (0,2 ppm) confere uma vida útil de 14 dias ao produto *in natura*, enquanto que o pescado armazenado sem a adição de ozônio atinge apenas 7 dias. Além disso, cabe ressaltar que o sistema de conservação com ozônio também infere reduções significativas da atividade dos principais mecanismos responsáveis pela hidrólise e oxidação lipídica em carnes de pescado investigadas.

Pastoriza *et al.* (2008a) submeteu o megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*) a água e o gelo em escama ozonizado e verificou-se os efeitos na conservação do pescado fresco. Pastoriza *et al.* (2008b) submeteu a pescada (*Merluccius merluccius*) a água esterilizada e ozonizada, gelo em escama ozonizado e avaliou-se os efeitos na conservação do pescado fresco. Peixes frescos devem sempre ser tratados com o objetivo de garantir uma qualidade adequada para o consumo, mas sem modificação tecnológica de suas características sensoriais originais.

Baseado nas características do ozônio, como agente sanitizante (pela redução da contaminação bacteriana), esta tecnologia surge como uma alternativa promissora na indústria do pescado, e dessa forma, como forma de melhorar a segurança alimentar dos produtos, como também aumentar a vida de prateleira (CHAWLA, 2006). Na Tabela 5 estão apresentados o resumo de aplicações de ozônio em peixes (concentração de ozônio e tempo de contato).

Percebe-se dessa forma que a preservação da qualidade e particularmente a segurança microbiológica durante o processamento e armazenamento do pescado é importante. E o uso do ozônio pode ser uma excelente alternativa para substituir o cloro, sem deixar resíduos tóxicos. A aplicação de ozônio em pescado ainda depende de legislação específica e estudos com variadas espécies, para garantir sua adição em concentração adequada e, assim, cumprir sua função como agente antimicrobiano, sem alterar e/ou danificar as características do alimento (SILVA & GONÇALVES, 2014).

Tabela 5: Aplicação do ozônio na indústria do pescado – concentração e tempo de contato do ozônio (O₃) com o pescado.

Ozônio	[O ₃] (mg L ⁻¹)	Tempo de contato	Produto	Finalidade do uso	Referência
Gelo ozonizado	0.6	20 dias	Bacalhau do atlântico	Aumento da vida de prateleira	Ravesi <i>et al.</i> (1987)
Água ozonizada	5.0-12.0	20-30 min	Bagre	Aumento da vida de prateleira	Brooks & Pierce (1990)
Água ozonizada refrigerada	5.0	5 min	Salmão	Aumento da vida de prateleira	Mairs <i>et al.</i> (1999)
Água ozonizada	5.00/10.0	10 min	Filé de bagre	Perfil microbiológico e Aumento da vida de prateleira	Kim <i>et al.</i> (2000)
Água ozonizada	1,33	2 min	Filé de salmão	Qualidade microbiológica	Hansen (2002)
Água ozonizada	6.0	60 min	Tilápia viva	Pré-tratamento do peixe vivo	Gelman <i>et al.</i> (2005)
Gelo Líquido ozonizado	0.17	22 dias	Sardinha	Qualidade sensorial e microbiológica – Armazenamento	Campos <i>et al.</i> (2005)
Gelo Líquido ozonizado	0.2	35 dias	Linguado	Aumento da vida de prateleira	Campos <i>et al.</i> (2006)
Exposição ao ozônio gasoso	0.1	20 min	Salmão-truta (processo de defumação a frio)	Perfil microbiológico (<i>Listeria innocua</i>)	Vaz-Velho <i>et al.</i> (2006)
Água e gelo em escama ozonizado	2.0	14 dias	Megrim (<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>)	Conservação de peixe fresco (manutenção da qualidade)	Pastoriza <i>et al.</i> (2008a)
Água ozonizada Gelo em escama ozonizado	2.0	18 dias	Pescada (<i>Merluccius merluccius</i>)	Conservação de peixe fresco (manutenção da qualidade)	Pastoriza <i>et al.</i> (2008b)
Sprays de Ozônio	1.5	6	Filé de Salmão	Segurança microbiológica (<i>L. monocytogenes</i>)	Crowe <i>et al.</i> (2012)

Fonte: Silva & Gonçalves (2014)

2.9 PADRÕES FÍSICO-QUÍMICOS PARA A GARANTIA DA QUALIDADE DO PESCADO FRESCO

2.9.1 O potencial hidrogeniônico (pH)

O potencial hidrogeniônico (pH) é comumente utilizado como parâmetro de frescor (SANTOS, 2013). A análise do pH em pescado consiste na medida da concentração de íons hidrogênio na amostra e seus valores podem variar entre 0 a 14, sendo considerado meio ácido quando os valores se encontram abaixo de 7, e meio básico quando os mesmos se apresentam acima de 7 (IAL, 2008).

O pH de peixe vivo está pouco acima de 7, normalmente assumindo valores na ordem dos 7,3 (GUERRA, 2013). Após a morte do pescado ocorrem fenômenos de glicólise

anaeróbia que resultam na acumulação de ácido láctico que conseqüentemente reduzem os valores de pH do músculo. O músculo dos peixes contém um nível de glicogênio relativamente baixo, em comparação ao dos mamíferos (TEIXEIRA, 2012).

A redução do pH é devido à geração de íons H⁺ associada à produção de ácido láctico, bem como o colapso das reservas de ATP. Essa diminuição geralmente provoca queda na qualidade do filé (SANTOS, 2013). Ao longo do tempo, o valor do pH vai aumentando gradualmente durante o período de conservação, devido à formação de substâncias, como amônia e trimetilamina, produzidos pelo desenvolvimento de microrganismos nos peixes. (TEIXEIRA, 2012; SANTOS, 2013). Quanto mais compostos são formados, maior o desenvolvimento microbiano, devido a aproximação ao valor de pH 7,0, considerado ótimo para o crescimento de microrganismos (LIMA, 2012). Desta forma, o pH próximo à neutralidade acelera o desenvolvimento de bactérias e, conseqüentemente, a degradação da carne (MONTEIRO, 2013). Portanto, o valor do pH pode influenciar no prazo de vida comercial dos peixes, pois as bactérias deteriorantes crescem melhor em faixas de pH mais alcalinas. (SANTOS, 2013).

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal (RIISPOA) é considerado impróprio para consumo peixes que apresentem valores de pH superiores ou igual a 6,5 (carne interna) (BRASIL, 1952).

Este Regulamento preconiza um limite único de pH para variadas espécies, porém algumas espécies de peixe logo após o *rigor mortis* já apresentam valores elevados de pH, podendo inclusive ser igual ou maior a 6,5, logo após a resolução deste fato este que permite inferir que o pH nem sempre é uma ferramenta adequada de qualidade. Sugere-se, com isso, que a legislação seja revista respeitando as espécies de peixes que possuem diferentes valores de pH após o rigor mortis (RODRIGUES *et al.*, 2012). Os valores de pH *post-mortem* de espécies marinhas selvagens e de aquicultura encontram-se no intervalo ente 6,1 e 6,5 (TEIXEIRA, 2012).

2.9.2 Análise da Cor | Colorimetria

A cor de um alimento deve-se à presença de pigmentos naturais. Estes pigmentos são instáveis, participam de diferentes reações e, em função disto, a alteração de cor de um

alimento é um indicador das alterações químicas e bioquímicas possíveis de ocorrer durante o processamento e estocagem (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Os consumidores muitas vezes avaliam a qualidade inicial do produto por sua cor (SCHUBRING, 2010). No caso do pescado, é um dos principais parâmetros avaliados pelos consumidores (VIEGAS *et al.*, 2012; SCHUBRING, 2010). Possui, portanto altíssima força de decisão, levando até mesmo ao esquecimento, momentâneo, das características nutricionais do produto (VAZ, 2005).

A cor dos alimentos não é estável, muda na medida em que diminui o frescor. A aparência de um peixe recém-desembarcado é inesquecível, apenas algumas horas após a morte, porém, ele começa a parecer menos atraente, obviamente, e suas cores agora comuns são muito mais familiar para a maioria do público (SCHUBRING, 2010). As características da cor do músculo podem ser afetadas pelo estresse antes do abate, pela idade do animal, a metodologia empregada na medição da cor, a natureza do estresse e pelos tratamentos antimicrobianos (OLIVEIRA, 2005).

As várias espécies de pescado apresentam coloração própria do músculo, líquido corporal, vísceras e, sobretudo, da pele e couro. Esta diversificação de cor se deve à presença de vários pigmentos, tais como mioglobina, hemoglobina, bilinas, hemocianina, carotenoides, melaninas, etc.). (RIBEIRO *et al.*, 2007). A coloração da carne do peixe não apresenta variações com relação ao sabor, contudo tem grande relação com a atratividade para o consumidor (BOMBARDELLI *et al.*, 2005).

A cor pode ser utilizada como um índice de transformações naturais de alimentos frescos ou de mudanças ocorridas durante o processamento industrial, sendo assim um importante parâmetro de qualidade. Instrumentalmente, a intensidade da cor é representada por a^* e b^* , ao passo que L^* indica a luminosidade, a^* intensidade da cor vermelho-verde e b^* intensidade da cor amarela-azul, do sistema CIELab (SANTOS, 2013).

No entanto, a características da imagem da carne, como a cor, tem sido amplamente aplicada na indústria de alimentos para avaliação da qualidade e inspeção de uma grande variedade de alimentos (SCHUBRING, 2010).

Diante disto se tem a importância da medição de cor na avaliação da qualidade e segurança no processamento do pescado. É uma das vantagens é o fato de o método de medição não é caro, e pode, portanto, ser aplicada em larga escala (SCHUBRING, 2010).

2.9.3 Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA)

Os processos de oxidação, nomeadamente a auto oxidação, envolvem apenas o oxigênio e os lipídios insaturados, e é responsável pelo aparecimento de cheiro e sabor ranço, o que pode limitar o tempo de armazenamento de espécies com alto teor lipídico (PESTANA, 2007). Os ácidos graxos polinsaturados encontrados no pescado torna-os suscetíveis à oxidação, levando à formação de peróxidos e produtos da degradação desses. As insaturações representam o centro ativo pelo qual se inicia a reação de oxidação que são causadas pelo oxigênio atmosférico, menos frequentemente pelo ozônio, peróxido, metais e outros agentes oxidantes (CHIATTONE, 2008).

Dessa maneira, a oxidação lipídica do peixe fresco pode ser prevenida ou retardada pela remoção do oxigênio do sistema ou pelo uso de antioxidantes (GONÇALVES *et al.*, 2000). No entanto, o ozônio, uma molécula triatômica do oxigênio, amplamente utilizado como agente antimicrobiano, possui uma forte ação oxidante, aumentando a formação de radicais livres, podendo acelerar as reações de oxidação os ácidos graxos, o que é indesejável (VIEIRA *et al.*, 2004; CHIATTONE, 2008). Portanto, a aplicação de ozônio em sistemas facilmente oxidáveis, como a gordura polinsaturada do pescado, pode se tornar um problema, pois o processo de oxidação lipídica poderia ser acelerado, causando depreciação da carne e a tonando inaceitável para o consumo. No entanto, alguns pesquisadores relataram que após o tratamento com ozônio não foi percebido aumento significativo da oxidação lipídica (MANOUSARIDIS *et al.*, 2004; CROWE *et al.*, 2012).

Do ponto de vista da deterioração do sabor dos alimentos, os peróxidos não são importantes, e sim, os produtos oriundos de sua decomposição (aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos) (BERTOLIN *et al.*, 2011). O aldeído malônico é o principal produto secundário da oxidação lipídica e tem sido detectado como substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (PEREIRA & TENUTA-FILHO, 2005). Um dos métodos mais utilizados para avaliar a estabilidade lipídica, segundo Fogaça & Sant'ana (2009) é o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), pela reação direta da solução do ácido 2-tiobarbitúrico com os tecidos do alimento produzindo uma coloração rosa, resultado da formação de um complexo entre os compostos oxidados de gordura, principalmente o malonaldeído, com o TBA. É um método recomendado e eficiente pela rapidez e simplicidade, e é utilizado no controle de qualidade de produtos susceptíveis à oxidação, pois fornece informações valiosas a respeito do estado oxidativo e da predição de rancidez do alimento analisado (OSAWA *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência antimicrobiana do ozônio no processamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do custo operacional para a produção de ozônio;
- Avaliar a relação do binômio “*concentração do ozônio*” (0,5; 1,0 e 1,5 ppm) e o “*tempo de exposição*” (5; 10 e 15 minutos) sobre:
 - a redução da carga microbiana na superfície da tilápia;
 - a redução da carga microbiana no processo de filetagem;
 - o pH e cor do filé de tilápia;
 - a oxidação lipídica do filé de tilápia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (D.I.C), num esquema fatorial 4x4 (Tabela 6), sendo constituído pelos fatores concentração da água (0 ppm - controle) e do agente antimicrobiano (água ozonizada 0,5; 1,0 e 1,5 ppm) e tempo de imersão (0 – controle; 5; 10 e 15 minutos)

Tabela 6: Fatores Concentração e Tempo no esquema fatorial 4x4

Concentração (ppm)	Tempo (minutos)			
	0	5	10	15
0,0	0,0 0	0,0 5	0,0 10	0,0 15
0,5	0,5 0	0,5 5	0,5 10	0,5 15
1,0	1,0 0	1,0 5	1,0 10	1,0 15
1.5	1,5 0	1,5 5	1,5 10	1,5 15

4.2 AQUISIÇÃO E TRANSPORTE DA MATÉRIA-PRIMA

Os exemplares de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram obtidos da Associação de Aquicultores de Apodi, previamente abatidas por choque térmico em água e gelo. As tilápias, com peso médio de 650g, foram imediatamente acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo em escamas na proporção 1:1, e transportadas ao Laboratório de Tecnologia e Controle de Qualidade do Pescado (LAPESC/UFERSA).

4.3 OBTENÇÃO DA ÁGUA OZONIZADA

O sistema de geração de ozônio foi instalado no LAPESC, conforme Figura 4. Para os testes simulando processamento em planta industrial, a obtenção de água ozonizada foi realizada através de um gerador de ozônio por descarga elétrica (por efeito corona) em oxigênio purificado, utilizando um secador de ar e concentrador de oxigênio (mínimo de 90% de O₂) projetado para sistemas geradores de ozônio em planta industrial da marca O3R Philozon. A água ozonizada foi mantida em um tanque retangular (86 x 56 x 48 cm) com recirculação a fim de manter os níveis de ozônio constante no reservatório e em temperatura de refrigeração de 11°C até sua utilização posterior.

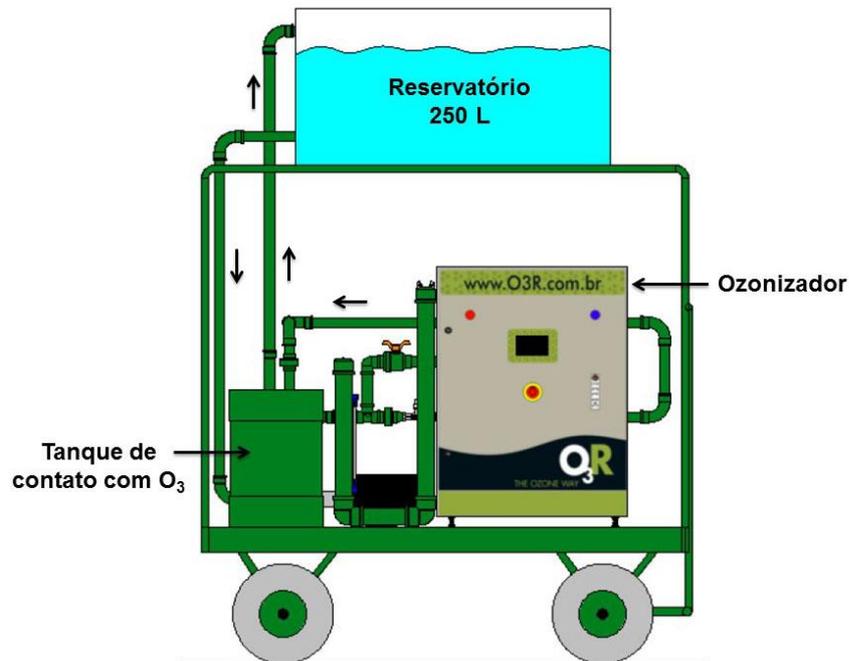


Figura 4. Esquema do sistema de geração de ozônio e produção de água ozonizada para testes de simulando planta industrial (Fonte: O3R Philozon).

4.4 MENSURAÇÃO DO OZÔNIO RESIDUAL EM ÁGUA

A concentração de ozônio residual (mgO_3/L) presente na água foi mensurada pelo método colorimétrico do índigo (APHA,1995), feitos em triplicata.

Segundo Chiattonne (2010) esse método foi aceito mundialmente pelo *Environmental Protection Agency* (EPA), é o único método a constar no *Standards methods for the examination of water and wastewater*. Sensível, preciso e rápido, o método do índigo é mais seletivo para o ozônio que os outros métodos. Esse método está baseado na oxidação do corante índigo pela molécula do ozônio, causando redução na intensidade da cor azul.

O equipamento foi configurado para ozonizar numa faixa de Potencial de oxidação redução (ORP) e a partir daí o ozônio residual foi quantificado, até a obtenção das três concentrações desejadas (0,5; 1,0; 1,5 ppm). Todo experimento foi feito com controle da temperatura da água (11°C).

4.5 EXPERIMENTOS

4.5.1 Efeito da água ozonizada sobre a carga microbiana da tilápia inteira

Para verificar a influência das concentrações de ozônio na redução da carga microbiana superficial, o experimento seguiu um fluxograma operacional apresentado na Figura 5.

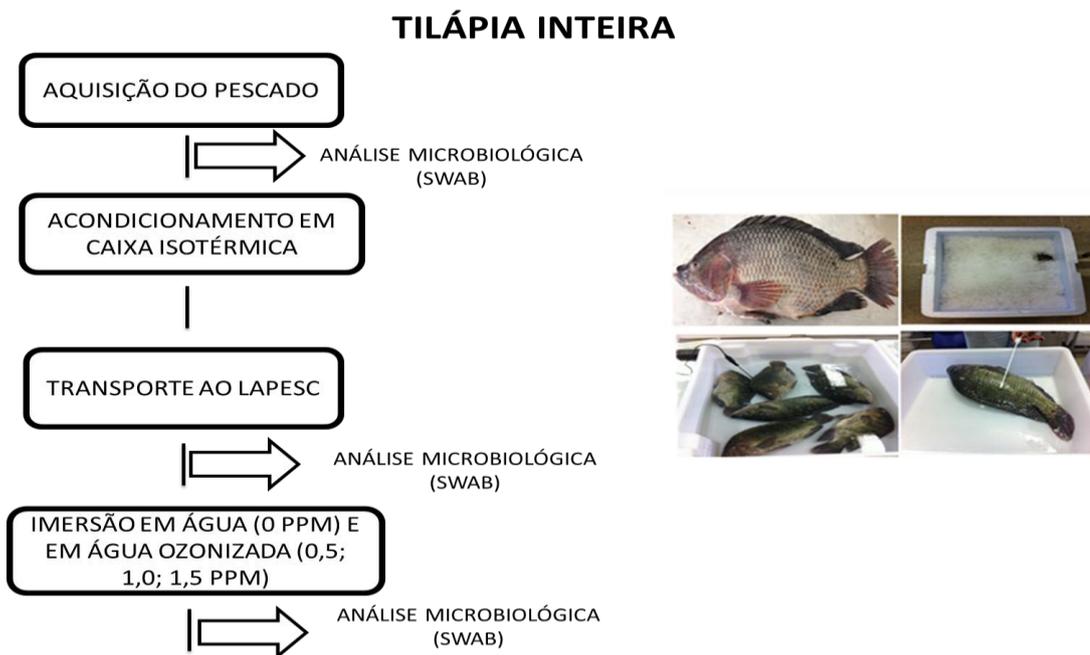


Figura 5. Fluxograma do processo de imersão em água (0 ppm) e em água ozonizada (0,5; 1,0; 1,5 ppm)

Inicialmente as amostras de tilápias inteiras foram adquiridas e feita a primeira coleta para análise microbiológica, em seguida as amostras foram submetidas ao acondicionamento em caixas isotérmicas com gelo, posteriormente as amostras foram transportadas ao LAPESC. Ao chegar ao LAPESC, foi feita outra coleta do material superficial para a análise microbiológica. As amostras de tilápias inteiras foram imersas em água (0 ppm) e em água ozonizada (0,5; 1,0; 1,5 ppm), a temperatura de 11°C, durante 0; 5; 10; e 15 minutos de imersão e após a imersão foi feita a última coleta do material para a análise microbiológica (Figura 5). Permitindo, dessa forma, avaliar a relação do binômio “*concentração do ozônio*” e o “*tempo de exposição*” sobre a redução da carga microbiana superficial.

4.5.2 Efeito da água ozonizada no processamento de filetagem da tilápia do Nilo

Para verificar a influência das concentrações de ozônio na redução da carga microbiana durante o processo de filetagem da tilápia do Nilo, o experimento seguiu um fluxograma operacional apresentado na Figura 6.

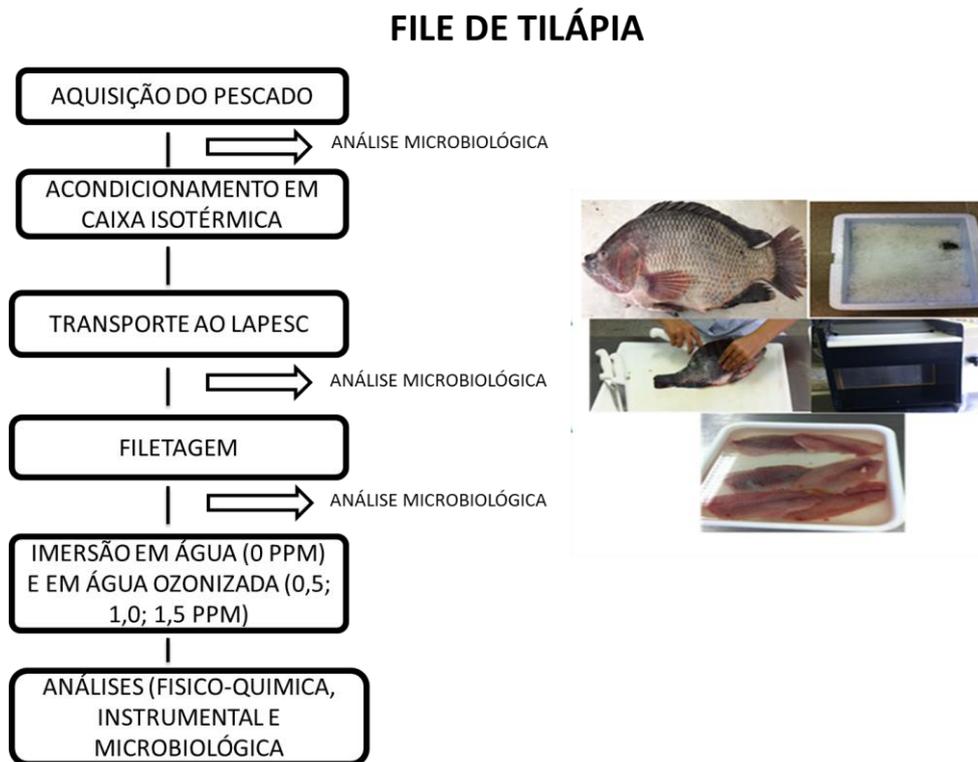


Figura 6. Fluxograma do processo de imersão do filé em água (0 ppm) e em água ozonizada (0,5; 1,0; 1,5 ppm)

Utilizou-se tilápias inteiras que após a aquisição foram mantidas em caixas isotérmicas com gelo e posteriormente transportadas ao LAPESC. Foram coletadas amostras do músculo da tilápia para a análise microbiológica. Em seguida, as amostras foram submetidas à filetagem, remoção da pele através de uma despeliculadora (marca “Brusinox”, modelo “Skin 3000”). Posteriormente, as amostras foram imersas em água (0 ppm) e água ozonizada (0,5; 1,0; 1,5 ppm), a temperatura de 11°C, durante 0; 5; 10; e 15 minutos de imersão. Com a finalidade de comparar a melhor concentração do ozônio e tempo de exposição sobre a redução da carga microbiana (contagem total de mesófilos aeróbios, *Staphylococcus* coag positivo, coliformes termotolerantes e presença de *Salmonella*), alteração do pH, cor do filé e na estabilidade oxidativa, permitindo dessa forma avaliar a relação do binômio “concentração do ozônio” e o “tempo de exposição” sobre estes parâmetros.

4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A análise microbiológica das amostras foi realizada em todas as etapas do processamento (tilápias inteiras, após o transporte, após a imersão em água (controle) e água ozonizada), para avaliar a eficiência antimicrobiana do ozônio na redução da carga microbiana. A coleta do material superficial da tilápia inteira deu-se através da técnica de *swab*. Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo, transportadas e processadas no Laboratório de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA) para serem submetidas às análises microbiológicas.

Para o filé da tilápia, após a imersão em água (0 ppm) e água ozonizada, 100 g de filés foram pesadas em balança analítica de precisão (Shimadzu, modelo BL3200H), inseridas em recipientes estéreis, e encaminhadas ao Centro de Análises Clínicas e Imunológicas de Mossoró (CACIM) para análise. As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa N°62 (BRASIL, 2003).

As análises microbiológicas realizadas incluíram contagem total de mesófilos aeróbios, *Staphylococcus aureus* coag positiva, coliformes termotolerantes e presença de *Salmonella spp*. Dentre os parâmetros analisados, apenas *Salmonella spp* e *Staphylococcus aureus* coag. positiva são exigidos pela legislação vigente (Brasil, 2001). Apesar da legislação não possuir padrões para contagem total de mesófilos e coliformes termotolerantes para pescado *in natura*, tais análises foram realizadas, pois a presença desses microrganismos indica as condições higiênico-sanitárias do pescado.

4.7 MEDIÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

A análise de pH (TERRA & BRUM, 1998) dos filés de tilápia foi realizada através de um potenciômetro digital de leitura de pH de carnes (marca “Hanna”, modelo “HI 2221”). Pesou-se 10 g de peixe e o diluiu em 50 mL de água destilada. O pH foi determinado com o aparelho calibrado. A análise foi realizada em triplicata. As amostragens foram realizadas após 5; 10 e 15 minutos de imersão em água sem ozônio (Controle - 0 ppm) e água ozonizada (0,5; 1,0; 1,5 ppm).

4.8 ANÁLISE DA COR

A cor do filé foi avaliada em três pontos distintos por amostra, determinada com auxílio de um calorímetro portátil (Konica Minolta, modelo CM-700D - Figura 7), com a escala L*(Luminosidade), a*(Componente vermelho), b*(Componente amarelo) do sistema CIELab . A calibração do aparelho foi realizada conforme as instruções do fabricante. Todas as amostras foram medidas em triplicata. O sistema de leitura do calorímetro foi feito diretamente no display, onde a cada leitura, apareceram os valores de L*, a* e b*.



Figura 7. Determinação da cor do filé de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

4.9 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA ATRAVÉS DO TESTE DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA)

O TBA foi determinado, através do método descrito por Tarladgis *et al.* (1960), após a lavagem do filé das tilápias com água pura (0 ppm) e ozonizada afim de avaliar o desencadeamento do processo de oxidação lipídica após o tratamento com água ozonizada. A reação foi medida espectrofotometricamente em comprimentos de onda de 538nm. As amostras foram analisadas em triplicata (ANEXO). Os resultados do índice de TBA dos filés de tilápia submetidos aos tratamentos foram expressos em mg MA/kg.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de pH, cor e TBA foram submetidos à avaliação de homocedasticidade e normalidade, não sendo identificados dados (outliers e influentes), em seguida submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste *Tukey* a 5% de probabilidade, através do software estatístico R – Development Core Team (2011). As médias de pH, TBA e parâmetros de cor foram comparadas pelo teste *t*-Student para determinar possíveis diferenças significativas ao longo do tempo de exposição do ozônio. Os gráficos foram construídos com o software SigmaPlot para Windows V. 10 (Systat Software, Inc.).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MENSURAÇÃO DO OZÔNIO RESIDUAL EM ÁGUA

Os resultados da relação do potencial oxi-redução (ORP) e ozônio residual na água estão apresentados na Tabela 7. O equipamento foi configurado para ozonizar dentro da faixa desejada (Set Point) e ao mesmo tempo quantificou-se cada nível de ORP (em mV), e o que este representa em concentração de ozônio residual (em ppm). Percebe-se que a concentração de ozônio aumentou de acordo com ORP da água. Cada concentração de ozônio residual foi mantida estável – através do sistema de recirculação – e utilizada nos experimentos posteriores.

Tabela 7: Concentração de ozônio na água (n= 3)

Set Point ORP (mV)	ORP mensurado (mV)	[O ₃] ppm
860 880	889	0,52 ± 0,02
940 960	955	1,0 ± 0,09
960 980	980	1,5 ± 0,08

A possibilidade de uma adequada mensuração do ozônio refletirá no custo e na eficiência de geradores de ozônio (SILVA *et al.*, 2011). Sabendo que o consumo elétrico do gerador de ozônio é de 0,7 kWh, que o tempo para atingir as concentrações de ozônio desejadas na água (0,5; 1,0 e 1,5 ppm) para o volume de 170 litros foi de 20, 50 e 60 minutos, respectivamente, calculou-se o custo do consumo de energia elétrica (valor comercial equivalente a R\$ 0,55/kWh) utilizada para geração do ozônio nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 ppm, conforme a tabela 8.

Tabela 8: Custo com energia elétrica do gerador de ozônio

Concentração de Ozônio (ppm)	Tempo (min)	Custo R\$
0,5	20	0,12
1,0	50	0,32
1,5	60	0,38

O cálculo do custo foi estimado apenas para o tempo de ozonização para atingir as concentrações de ozônio (volume de 170 litros) utilizadas para a imersão da tilápia na água ozonizada. Supondo uma situação dentro de uma indústria de processamento do pescado, onde se gasta um volume de água de 10 L/kg de matéria prima para lavagem, evisceração e filetagem, e utilizando a maior concentração de ozônio (1,5 ppm), seria necessário para a lavagem de 1 tonelada de peixe 10.000 L de água e o tempo de 1 hora para a ozonização da água, desta forma, o custo com energia elétrica do gerador de ozônio seria de aproximadamente R\$ 23,00.

5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.2.1 Efeito do resfriamento em gelo sobre a carga microbiana da tilápia do Nilo inteira

Os resultados da contagem total de mesófilos na superfície das Tilápias antes e após o transporte estão apresentados na Tabela 9 e demonstraram que o resfriamento em gelo proporcionou uma redução das bactérias mesófilas.

Tabela 9: Efeito do gelo na redução microbiana (Contagem Total de Mesófilos - Log₁₀ UFC/cm²) - *Swab* de superfície.

Tilápia do Nilo	Contagem Total de Mesófilos <i>Swab</i> de superfície (log ₁₀ UFC/cm ²)
Inteira (<i>in natura</i> – na despesca)	4,05
Inteira (em gelo – no LAPESC)	3,65

Quando o gelo é empregado de maneira correta e na quantidade adequada sobre o pescado, este contribui para sua conservação, seja na redução de sua temperatura (até 0°C), ou no retardo das alterações enzimáticas e bacterianas (LIMA, 2002). Dessa forma, o armazenamento do pescado em gelo, logo após a captura ou despesca é importante para minimizar processos autolíticos e a proliferação microbiana.

Esta redução de temperatura é fundamental para a manutenção da qualidade do pescado visto que ao reduzir a temperatura, a velocidade de multiplicação dos microrganismos também diminui, haja vista o distanciamento de sua temperatura ótima de crescimento. A diminuição da temperatura do pescado a 5°C, por exemplo, inibe o

crescimento de alguns microrganismos à medida que para outros essa temperatura provoca apenas um retardo de sua multiplicação (SILVEIRA, 2013).

Além da redução em aproximadamente 10% na contagem total de mesófilos, não houve contaminação por coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva em todas as amostras, atendendo integralmente ao padrão estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2001), e indicando que as condições higiênico-sanitárias adotadas ao longo da despesca, abate, resfriamento, armazenamento e transporte foram satisfatórias, o que pode contribuir de forma significativa para a o aumento na vida-de-prateleira, pouco uso ou baixas concentrações de sanitizantes, evitando-se, desta forma, possíveis doenças transmitidas por estes alimentos.

Os resultados encontrados nessa pesquisa corroboram com o estudo de outros autores, como, Soares *et al.* (2012), os quais detectaram a ausência de crescimento de *S. aureus* coagulase positivo em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o armazenamento em gelo, e Simões *et al.* (2007) na avaliação da qualidade microbiológica de filés de tilápia tailandesa (*Oreochromis* spp.).

Outros autores estudando a presença de bactérias mesófilas, *Salmonella* e *E. coli*. em pescado fresco comercializado verificaram baixo risco para a saúde do consumidor, por estarem bem armazenados sob refrigeração ou em gelo. Damasceno (2009) verificou ausência de *Salmonella* spp. e baixa contagem de *S. aureus* coagulase positivo (valores inferiores a 2,0 log UFC/g) em salmão refrigerado. Silveira (2013) avaliou a qualidade microbiológica de tilápia inteira mantida em gelo, e observou que a contagem inicial de bactérias mesófilas foi 3,20 log e após dois dias refrigerado encontrou valores de 2,99 log. Santos *et al.* (2014) avaliaram a qualidade microbiológica da pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) resfriada, e observaram ausência de *Salmonella* sp e *Escherichia coli*; e contagens para de *S. aureus* coagulase positivo (2,0 log UFC/g) dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

A legislação brasileira não determina valor padrão para contagem total de mesófilos para pescado. No entanto, quando presentes em números elevados poderão causar deterioração e/ou a redução da sua vida de prateleira, portanto, os limites sugeridos por Franco & Landgraf (1996) foram adotados neste trabalho. Estes recomendam o limite de 10^8 UFC/ g para mesófilos, esses valores serão considerados impróprios para consumo.

Apesar da legislação brasileira não exigir contagem de bactérias mesófilas, quando são elevadas são indicativo de contaminação durante a captura e beneficiamento podendo indicar condições deteriorantes relacionadas ao frescor, levando a alterações organolépticas. Desta forma, tem-se a necessidade das boas práticas higiênico-sanitárias e controle da temperatura em todas as etapas pós captura.

A ausência de coliformes termotolerantes, *S. aureus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. no presente trabalho confirmou que os procedimentos higiênicos-sanitários foram corretamente seguidos desde a captura até a preparação da matéria-prima.

5.2.2 Efeito da água ozonizada sobre a carga microbiana da tilápia do Nilo inteira

Os resultados do efeito antimicrobiano da água ozonizada sobre a contagem total de mesófilos aeróbios na superfície da tilápia do Nilo inteira estão apresentados na Figura 8. Verificou-se que no grupo controle (sem tratamento com ozônio) não houve redução da contagem de mesófilos, pelo contrário, houve um crescimento ao longo do tempo de imersão em água. A carga microbiana inicial passou de 3,65 log UFC/cm² para 4,46 log UFC/cm² no final do tratamento, indicando crescimento de 0,81 log UFC/cm². Isso pode ser explicado pelo fato da água (0ppm) não apresentar um poder sanificante, e ao mesmo tempo, a imersão em água fria (11°C) do muco superficial da tilápia (fonte de bactérias).

Como esperado, o efeito antimicrobiano da água ozonizada foi observado no tratamento com maior concentração (1,5 ppm), reduzindo em 91,78% a carga microbiana inicial de bactérias mesófilas (de 3,65 log UFC/cm² para 0,30 log UFC/cm²), seguido do tratamento com concentração 1,0 ppm (redução de 83,56%) e 0,5 ppm (redução de 78,08%). Percebeu-se que com o aumento do tempo de contato da tilápia com a água ozonizada, houve uma redução do poder oxidante em todos os tratamentos devido à instabilidade da molécula triatômica do ozônio (O₃), que facilmente se decompõe em oxigênio (O₂) logo no início do contato, liberando um radical livre (O•) que oxida a bactéria, e, portanto, a redução passa a ser menor. Diante disto, para a redução da carga microbiana, a água ozonizada (0,5; 1,0 e 1,5 ppm) apresentou maior eficiência nos primeiros 5 minutos de contato, reduzindo a carga bacteriana em 49,32%, 60,27% e 71,23%, respectivamente.

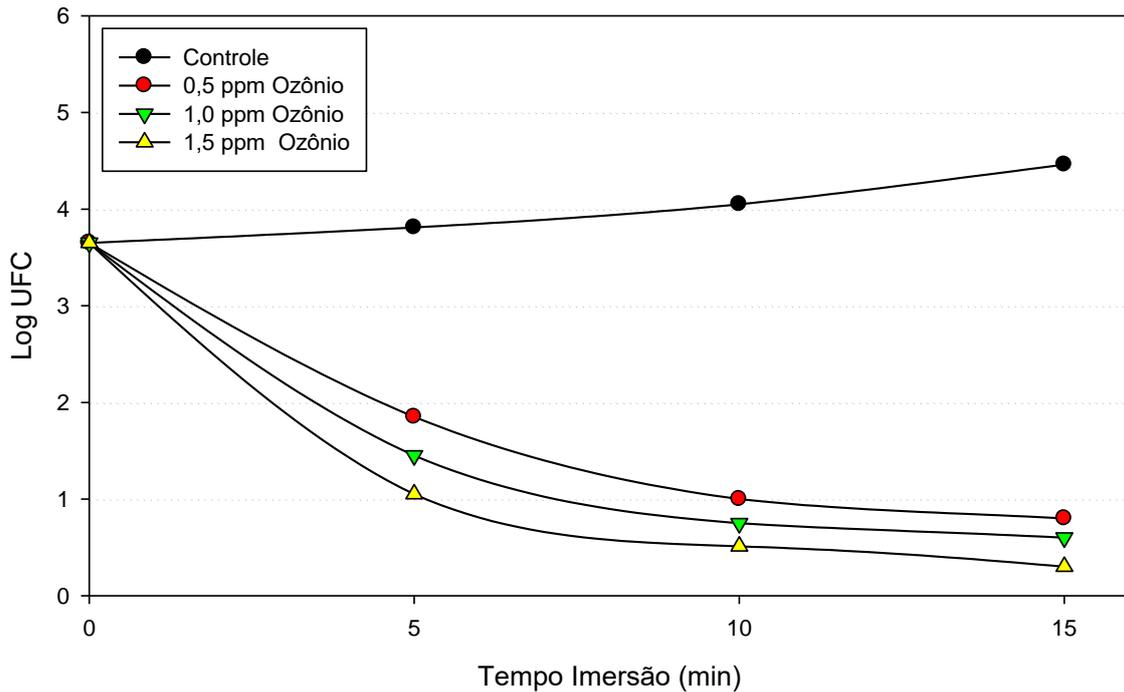


Figura 8. Efeito da água ozonizada na redução microbiana (Contagem Total de Mesófilos - Log₁₀ UFC/cm²) da superfície da tilápia do Nilo - Swab de Superfície.

Dados da literatura também relatam a redução de mesófilos no pescado quando submetido ao tratamento com ozônio. Tomita *et al.* (2015) estudaram a eficiência do ozônio como agente antimicrobiano na água de processamento da pescada Goete (*Scianidae*) e demonstraram redução de mesófilos após a lavagem com água ozonizada a 2 ppm.

A ação antimicrobiana do ozônio foi observada também por Campos *et al.* (2005) onde estudaram a eficiência do gelo em escama, e gelo líquido ozonizado no armazenamento de sardinha (*Sardina pilchardus*). O uso combinado do gelo líquido e ozônio proporcionou a redução do crescimento de bactérias mesófilas aos 12 dias de armazenamento. As amostras de sardinhas controle (armazenadas em gelo líquido e gelo em escama sem ozônio) apresentaram um aumento nas populações de bactérias mesófilas (de $10^5 - 10^6$ log UFC/cm² e $10^6 - 10^7$ log UFC/cm², respectivamente).

Campos *et al.* (2006) estudaram a eficiência do ozônio no armazenamento refrigerado do linguado (*Psetta maxima*) em gelo líquido (40% de gelo e 60% de água ozonizada - 0,2 ppm) e também verificaram alta eficiência antimicrobiana do ozônio na diminuição o crescimento bacteriano na superfície do linguado (de 2,00 log UFC/cm² para 0,00 log UFC/cm²), em comparação com o gelo líquido. Nesse estudo, os autores utilizaram baixa

concentração de ozônio, no entanto, como utilizaram o ozônio em soluções com baixa temperatura, sua estabilidade é maior, e, portanto, sua eficácia aumentou.

Pastoriza *et al.* (2008a) avaliaram a eficiência antimicrobiana da água e gelo em escama com ozônio (2 ppm), aplicada no linguado (*Lepidorhombus whiffiagonis*) e verificaram redução da população bacteriana durante o armazenamento por 14 dias. Gelman *et al.* (2005) estudaram o tratamento com a ozonização (6 ppm) da tilápia viva em tanques. O pré-tratamento com ozônio prolongou a vida de prateleira em 12 dias. As contagens totais de bactérias na superfície da tilápia foram inferiores a 2-3 log UFC/cm² do que o controle, e os músculos mantiveram-se praticamente estéreis por 30 dias, indicando que a combinação do pré-tratamento do ozônio com o armazenamento a 0°C ser um meio viável de prolongar a vida de prateleira do pescado.

Blogoslawski & Stewart (2011) estudaram a conservação do salmão (*Oncorhynchus nerka*) em água do mar ozonizada. O ozônio aplicado foi de 2 ppm para fazer uma solução a 0,5 ppm residual no gelo. O salmão conservado em gelo não ozonizado já se apresentou degradado no quarto dia após a captura, em contraste, o salmão preservado no gelo ozonizado manteve-se fresco durante oito dias.

Alguns autores estudaram o efeito ozônio em mexilhões. Manousaridis *et al.* (2005) registraram uma redução na contagem total de mesófilos, sendo que na amostra controle (sem ozônio) a contagem foi de 3,4 log UFC/g, enquanto que as contagens em amostras ozonizadas (1 ppm) para 60 e 90 minutos foram de 3,1 e 2,7 log UFC/g, respectivamente. A redução na contagem total de mesófilos de 0,7 log UFC/g foi observada pela ozonização, entretanto, esse tempo de contato provavelmente não possa ser viável para uma indústria de processamento devido ao tempo gasto na lavagem do pescado, desse modo reduzindo a produção da indústria. Schneider *et al.* (1991) observaram a redução do *V. vulnificus* de 2 log nas carnes de Amêijoia-mercenária (*Mercenaria mercenaria*) após a depuração com água ozonizada (0,2 a 1,1 ppm), quando comparado com as amostras do tratamento controle (sem ozônio). Após o tratamento, observou-se que a extensão no período de vida de prateleira das almeijoas foi obtido pela ozonização.

Observando-se os resultados obtidos no presente estudo, e dos dados encontrados na literatura, o tratamento com água ozonizada mostrou-se satisfatório na redução da carga microbiana, podendo desta forma melhorar a qualidade de armazenamento e consequentemente aumentar a vida de prateleira, pois o ozônio tem ação antimicrobiana sob

os mesófilos que estão relacionados com a população deteriorante que age em carnes sob refrigeração.

5.2.3 Efeito da água ozonizada no processamento de filetagem da tilápia do Nilo

Os resultados do efeito antimicrobiano da água ozonizada sobre a contagem total de mesófilos aeróbios no processo de filetagem da tilápia do Nilo estão apresentados na Figura 9.

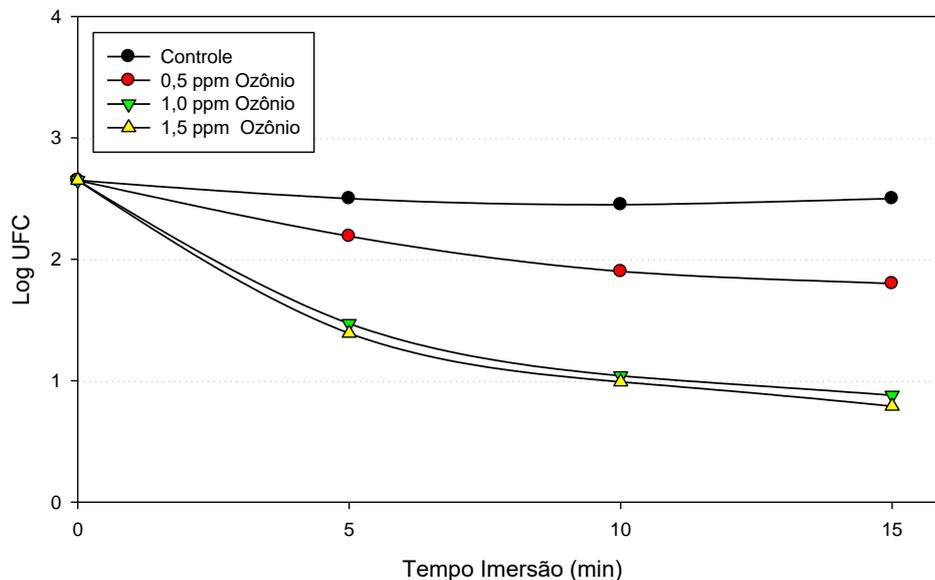


Figura 9. Efeito da água ozonizada na redução microbiana (Contagem Total de Mesófilos – Log₁₀ UFC/g) nos filés de tilápia do Nilo.

No tratamento controle (sem ozônio) houve uma redução de 5,66% na contagem total de mesófilos, sendo observado essa redução apenas após 5 e 10 minutos de imersão, provavelmente, ao fato de que a água tenha apenas diluído a carga microbiana pela lavagem, permanecendo estável, com tendência a um leve aumento no final da etapa de lavagem.

A imersão do filé em água ozonizada (0,5; 1,0 e 1,5 ppm) apresentou uma redução total de contagem total de mesófilos de 32,08%; 66,79% e 70,19%, respectivamente, e a ação antimicrobiana do ozônio, como esperado, aumentou de acordo com o aumento da concentração do ozônio. Diante disto, a água ozonizada a 1,0 e 1,5 ppm demonstraram ter o maior potencial oxidante na redução dos microrganismos devido apresentar a maior concentração de ozônio. Levando em consideração o gasto com energia elétrica, a água ozonizada com 1,0 ppm passa a ser mais viável economicamente.

O tempo que apresentou maior eficiência da água ozonizada nos tratamentos 0,5; 1,0 e 1,5 ppm para a redução da carga microbiana foram aos primeiros 5 minutos de contato, reduzindo as populações iniciais de bactérias mesófilas em 17,36%, 44,53% e 47,55%, respectivamente, demonstrando que o ozônio em solução aquosa tem sua eficácia maior nos primeiros minutos de contato. Os resultados obtidos nas análises de contagem total de mesófilos demonstraram que nos filés os valores estavam sempre abaixo do valor recomendado, 10^6 UFC/g.

Dados da literatura relatam a redução da carga microbiana do músculo do peixe após o tratamento com água ozonizada. Bono & Badalucco (2012) estudaram a eficiência da água ozonizada (0,3 ppm) combinada com a atmosfera modificada no processamento do salmote listrado (*Mullus surmuletus*). O uso combinado da água ozonizada com atmosfera modificada atrasou o crescimento bacteriano no músculo do peixe, apresentando baixos níveis de contagem total de mesofilos (2,5 log UFC/g) quando comparada com as amostras controle (3,7 log UFC/g). Portanto, o tratamento água ozonizada associado a embalagem com atmosfera modificada prorroga o prazo de validade do pescado mantendo a segurança e a qualidade do alimento.

Campos *et al.* (2006) estudaram a eficiência do ozônio no armazenamento refrigerado no músculo do linguado (*Psetta maxima*) em gelo líquido (40% de gelo e 60% de água ozonizada - 0,2 ppm) e verificaram que o gelo líquido ozonizado diminuiu o crescimento na contagem total de aeróbios no músculo do linguado, apresentando valores inferiores a 10^5 UFC/g em comparação com o gelo líquido (sem ozônio) que atingiram níveis acima de 10^6 UFC/g, após 28 dias de armazenamento. Isto indica que o uso do ozônio afeta diretamente o crescimento dos microrganismos.

Durante todo o experimento a pesquisa por *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, *Salmonella sp*, coliformes termotolerantes obtiveram resultados negativos em todas as amostras, atendendo, portanto, aos padrões microbiológicos que determina a ANVISA (BRASIL, 2001). Os resultados ocorreram, supostamente, pelo fato das amostras serem recém abatidas e havendo o mínimo de manipulação durante o processamento e a manipulação higienicamente pode explicar a ausência dos microrganismos nas amostras.

Tal fato ocorreu conforme o esperado, já que o *S. aureus* coagulase positivo é uma bactéria patogênica que não faz parte da flora microbiana normal dos peixes (SOARES *et al.*, 2012). *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbio facultativo

(MONTEIRO, 2013), é o principal microrganismo envolvido nos surtos de intoxicação alimentar, responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções do mundo (DORIA, 2012; SIMÕES *et al.*, 2007). A sua presença em alimentos, relaciona-se à contaminação oriunda de manipulação e inadequada sanitização de utensílios e risco sanitário potencial, já que este microrganismo pode está presente nas mãos e mucosas dos manipuladores (FARIAS & FREITAS, 2008; GONÇALVES, 2011), o que torna evidente a importância do controle higiênico-sanitário nos estabelecimentos industriais e comerciais, quanto à mão-de-obra, equipamentos e superfícies que entram em contato com o pescado.

Salmonella sp. são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos. O pH ótimo para a multiplicação fica próximo de 7,0 e a temperatura ideal encontra-se na faixa de 35°C a 37°C sendo possível registrar o crescimento deste microrganismo em temperaturas que variam de 5°C até 47°C (MONTEIRO, 2013). A *Salmonella* não faz parte da microbiota normal do peixe, e quando presente, pode estar associado à manipulação inadequada em qualquer uma das etapas da cadeia produtiva ou por contato com água contaminada (LIMA, 2012). É o grupo de bactérias responsável pela maior frequência de doenças causadas pela contaminação de alimentos (MONTEIRO, 2013).

Os coliformes termotolerantes são bacilos Gram-negativos, não esporulados (MONTEIRO, 2013) e sua ocorrência em alimentos está diretamente relacionada com falhas no processamento ou contaminação de origem fecal recente, portanto, são utilizados como indicadores das condições higiênico-sanitárias de alimentos (LIMA, 2012). Desse modo, as boas práticas de fabricação e de higiene são essenciais para se lograr um produto aceitável em termos de qualidade microbiológica que não prejudiquem a vida de prateleira do produto como também a saúde do consumidor.

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), as amostras de filés de tilápia do Nilo tratadas com água ozonizada estariam aptas ao consumo, mostrando mais uma vez o efeito benéfico potencializado pela imersão do filé em água ozonizada.

5.3 FÍSICO-QUÍMICO

Para efeito de avaliação de interações entre os fatores estudados, os valores médios encontrados para pH, cor (sistema CIE L* a* b*) e TBA dos filés de tilápia estão apresentados na Tabela 10.

O pH da carne de tilápia diferiu significativamente entre as concentrações de ozônio e tempo de imersão ($p < 0,05$), no entanto, não foram observadas interações significativas ($p > 0,05$) entre esses fatores. O valor do pH da carne de tilápia imerso em água ozonizada foi superior na concentração de 1,5ppm quando comparado à concentração de 0,5 ppm. O pH foi mais alto no tempo de imersão de 5 minutos quando comparado aos demais tempos, demonstrando novamente que sua ação ocorre de imediato nos primeiros minutos de contato.

Tabela 10: Valores médios de pH, cor e TBA em filés de tilápia do Nilo lavadas com água sem ozônio (Controle) e com água ozonizada (0,5; 1,0 e 1,5 ppm) durante 0; 5; 10 e 15 minutos.

Parâmetro	Ozônio (ppm)				Tempo de Imersão (minutos)				CV (%)							
	0 ppm (Controle)	0,5	1,0	1,5	0	5	10	15								
pH	6,10 ^{ab}	6,08 ^b	6,13 ^{ab}	6,15 ^a	6,06 ^f	6,19 ^e	6,10 ^f	6,13 ^{ef}	7,76							
COR																
L	30,43 ^a	29,68 ^a	28,00 ^a	29,61 ^a	28,67 ^e	29,78 ^e	30,18 ^e	29,12 ^e	15,68							
a*	-1,163 ^a	-1,238 ^a	-0,82 ^a	-1,062 ^a	-0,27 ^e	-1,51 ^e	-1,49 ^e	-1,02 ^e	22,45							
b*	1,15 ^a	0,80 ^a	1,86 ^a	0,80 ^a	1,68 ^e	1,27 ^e	1,09 ^e	0,99 ^e	25,11							
TBA (mg MA/100g)																
(OZÔNIO ppm / TEMPO DE IMERSÃO minutos)																
0 ppm (Controle)				0,5				1				1,5				CV (%)
0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15	
0,68 ^A	0,64 ^B	0,64 ^B	0,64 ^B	0,68 ^E	0,69 ^E	0,77 ^F	0,83 ^G	0,68 ^I	0,75 ^J	0,77 ^J	0,97 ^K	0,68 ^I	0,85 ^N	0,96 ^O	1,19 ^P	16,39

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$), sendo ^{a,b,c,d} para ozônio; sendo ^{e,f,g,h} para o tempo de exposição; CV- Coeficiente de variação; Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$), sendo ^{A,B,C,D; E,F,G,H; I,J,K,L e M,N,O,P} para interação significativa entre as concentrações de ozônio) e tempo de exposição; CV- Coeficiente de variação.

Os valores L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho) e b* (intensidade de amarelo) dos filés analisados nos diferentes tratamentos e pode-se observar que não houve efeito significativo para interação entre concentração e tempo de imersão ($p > 0,5$) e não foram observadas interações significativas ($p > 0,05$) entre os fatores.

Os valores de TBA do filé de tilápia diferiram entre as concentrações de ozônio e tempo de imersão ($p < 0,05$) e foram observadas interações significativas ($p < 0,05$) entre esses fatores. Os valores de TBA do filé de tilápia imerso na água ozonizada foi superior na concentração de 1,5 ppm quando comparado aos valores de TBA do filé de tilápia imerso na água ozonizada com 0,5 e 1,0 ppm. Para os valores de TBA do filé imerso na água ozonizada foi superior no tempo de 15 minutos quando comparado aos valores de TBA imerso em água ozonizada nos tempos de 5 e 10 minutos.

5.3.1 pH

A variação do pH do filé de tilápia do Nilo durante as imersões em água ozonizada foram ilustradas na Figura 10, e verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de imersão. No tratamento controle (0 ppm) verificou-se aumento significativo do pH a partir de 15 minutos de imersão em água. Nos tratamentos com 0,5; 1,0 e 1,5 ppm de ozônio, verificou-se aumento significativo do pH a partir de 5 minutos de imersão, demonstrando o poder oxidante logo no início do contato com o ozônio, mas nas concentrações de 0,5 e 1,0 ppm a partir dos 10 minutos de imersão houve uma redução significativa dos valores do pH, permanecendo dentro dos limites legais para pescado fresco.

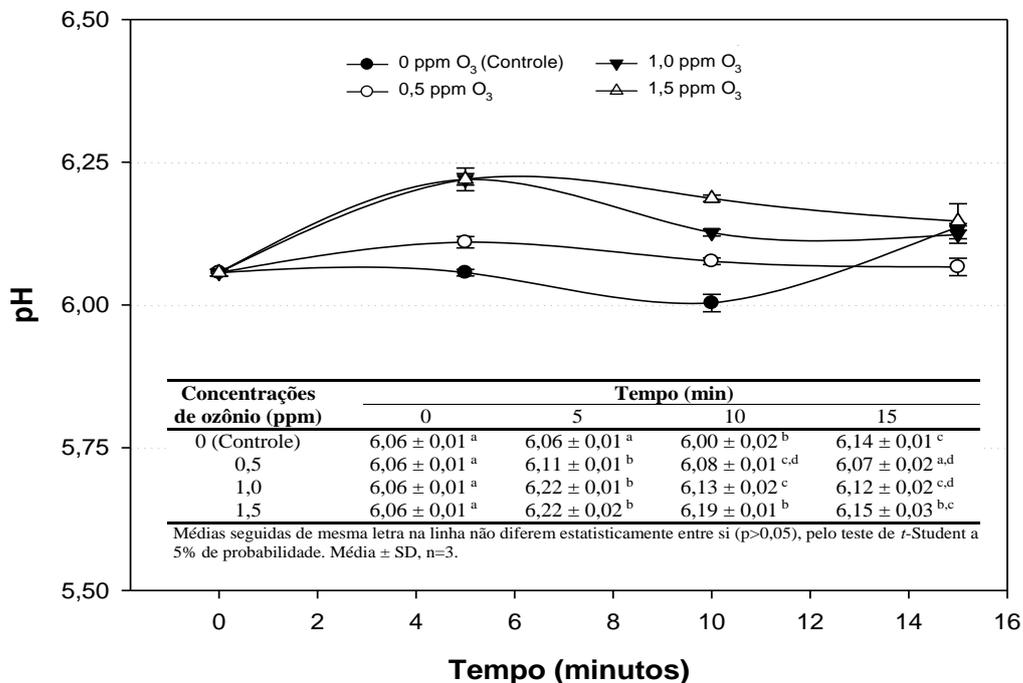


Figura 10. Variação de pH nos filés de tilápia do Nilo imersas em água ozonizada (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm) durante 0; 5; 10 e 15 minutos.

Na tilápia viva, o pH da carne situa-se em um valor ao redor de 7 a 7,2. Após a morte do peixe, o glicogênio é convertido anaerobicamente a ácido lático que ao se acumular no músculo reduz o pH para 6,2-6,5, no peixe fresco. Nesse estudo, os valores de pH variaram de 6,06 a 6,19, havendo um aumento significativo no valor do pH, mas a qualidade não foi afetada. Os baixos valores de pH encontrado nos filés de tilápia podem estar associados ao fato das tilápias serem cultivadas em tanques redes, permitindo a captura rápida, não havendo grande esforço e luta, portanto, preservando as reservas de glicogênio (SOARES, 2012).

Outros autores estudando a influência dos sanificantes em filé de tilápia, verificaram que o pH não foi alterado após submetidos aos tratamentos com os sanificantes. Oliveira (2005) tratou o filé de tilápia com sanificantes (dicloroisocianurato de sódio, dicloroisocianurato de sódio associado ao ultrassom, ozônio, ozônio associado ao ultrassom e o grupo controle), os valores do pH variaram entre 6,25 e 6,31, os filés submetidos aos tratamentos sanificantes não sofreram influências significativas ($p > 0,05$), isso mostra que os sanificantes não alteraram o pH dos filés. Portanto, as alterações observadas no pH não interferem na comercialização e no consumo.

Pastoriza *et al.* (2008a) trataram peixes com água ozonizada e armazenada com gelo em escama ozonizada (2 ppm) durante 8 e 12 dias. Os valores de pH foram mais baixo (6,79 e 7,00) que o controle (7,06 e 7,22), respectivamente. Rong *et al.* (2010) não observaram diferença no pH de ostras *in natura* e ostras tratadas com água ozonizada, sendo que o valor foi de 6,30 (controle) e 6,28 (água ozonizada).

Campos *et al.* (2005) observaram que o pH de sardinhas armazenadas por 22 dias em gelo líquido sofreu ligeiro aumento de 5,90 para 6,20 (sem ozônio) no final do armazenamento. Nas mesmas condições, porém utilizando gelo líquido ozonizado (0,17 ppm) o pH no final do armazenamento foi de 6,07. Fato pode ter ocorrido por não ocorrer à decomposição de compostos nitrogenados neste período, pois a decomposição eleva o pH.

5.3.2 Cor

Considerando que a mioglobina (Mb) é o principal pigmento responsável pela coloração marrom-avermelhada da carne do peixe e de outros animais vertebrados e invertebrados. A hemoglobina (Hb) também presente no músculo escuro, porém em pequenas concentrações, pouco contribui para a cor da carne, exceto nos casos em que haja rupturas dos vasos sanguíneos com acúmulo de sangue nos tecidos musculares (MAIA & OGAWA, 1999).

Quanto maior a porcentagem de Mb + Hb na carne, mais escuro é o músculo do peixe, refletindo um menor valor de L^* , uma vez que o máximo valor de L^* (luminosidade) é 100, e representa uma perfeita reflexão difusa (branco), enquanto que o valor mínimo é zero e constitui o preto (OLIVEIRA 2005; RIBEIRO *et al.*, 2007). Segundo Oliveira (2009) o pescado magro apresenta uma baixa concentração de hemopigmentos, favorecendo uma maior reflexão da luz e conseqüentemente aumentando o valor da luminosidade.

Na avaliação da cor realizada nos filés de tilápia, observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos tempos de imersão para o parâmetro L^* quando comparados ao controle (Tabela 11). No tratamento com 0,5 e 1,0 ppm, os tempos de imersão não diferiram do tempo 0, mas houve diferença entre os tempos 5, 10 e 15 minutos. No tratamento com 1,5 ppm, verificou-se uma redução significativa do L^* a partir dos 10 minutos de imersão, mas aos 15 minutos não houve diferença significativa entre os tempos 0, 5 e 15 minutos de imersão.

Tabela 11: Parâmetro de cor “ L^* ” (Luminosidade) nos filés de tilápia do Nilo lavadas com água ozonizada nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm durante 0; 5; 10 e 15 minutos de imersão.

Concentrações de ozônio (ppm)	Tempo (min)			
	0	5	10	15
0 (Controle)	32,03 ± 1,86 ^a	30,11 ± 0,46 ^a	32,24 ± 1,83 ^a	32,24 ± 1,83 ^a
0,5	32,03 ± 1,86 ^a	28,12 ± 1,78 ^{ab}	30,86 ± 0,65 ^{ac}	29,55 ± 0,70 ^{ad}
1,0	32,03 ± 1,86 ^a	28,42 ± 0,23 ^{ab}	32,88 ± 0,56 ^{ac}	29,22 ± 0,90 ^{ad}
1,5	32,03 ± 1,86 ^a	30,64 ± 0,85 ^a	28,71 ± 0,69 ^{ab}	28,82 ± 1,89 ^a

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de *t*-Student a 5% de probabilidade. Média ± SD, n=3.

Valores superiores foram relatados por Oliveira (2005) em filé de tilápia imerso em água ozonizada (3,0 – 3,5 ppm) por 20 minutos e foi observado valor de $L^* = 43,94$, resultando em filés com luminosidade mais elevada que o tratamento controle, $L^* = 41,94$, e por Schubring (2010) quando tratou o “Minced fish” com peróxido de hidrogênio, os valores de L^* aumentaram com os níveis de peróxido de hidrogênio

O parâmetro da luminosidade (L^*) não sofreu interferência da água ozonizada, conforme observado na Tabela 11. Apresentou resultados inferiores aos relatados na literatura para filé de peixe, conforme estudos reportados anteriormente, portanto, apresentando baixa luminosidade, ou coloração escura, o que pode ser atribuído a fatores como as condições biológicas da espécie (sexo, idade, escore corporal), condições de criação (meio de cultivo e alimentação), as condições de armazenamento e o tipo de manuseio a que estão sujeitos (SANTOS, 2013).

Observou-se para o parâmetro a^* no tratamento controle que após a imersão em água (0 ppm) verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de 10 minutos e uma redução no tempo de 15 minutos (Tabela 12). No tratamento com 0,5 e 1,0 ppm não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o parâmetro a^* nos tempos de imersão. No tratamento

com 1,5 ppm verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de 5 minutos de imersão, ou seja, propiciou uma carne levemente cinza, em seguida havendo uma redução dos valores de a^* no tempo de 10 minutos e no tempo de 15 minutos houve um aumento. Os valores encontrados para a^* mostram que os pigmentos de cor não foram afetados pelo ozônio.

Tabela 12: Parâmetro de cor “a” (Vermelho (+a) e Verde (-a)) nos filés de tilápia do Nilo lavadas com água ozonizada nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm durante 0; 5; 10 e 15 minutos de imersão.

Concentrações de ozônio (ppm)	Tempo (min)			
	0	5	10	15
0 (Controle)	$-1,55 \pm 0,31^a$	$-1,48 \pm 0,06^a$	$-1,87 \pm 0,31^{ab}$	$-1,20 \pm 0,20^{ac}$
0,5	$-1,55 \pm 0,31^a$	$-1,31 \pm 0,08^a$	$-1,45 \pm 0,15^a$	$-1,39 \pm 0,11^a$
1,0	$-1,55 \pm 0,31^a$	$-1,57 \pm 0,26^a$	$-1,77 \pm 0,08^a$	$-1,91 \pm 0,16^a$
1,5	$-1,55 \pm 0,31^a$	$-2,03 \pm 0,20^{ab}$	$-1,44 \pm 0,08^{ac}$	$-1,82 \pm 0,09^{ad}$

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de *t*-Student a 5% de probabilidade. Média \pm SD, $n=3$.

A coordenada a^* varia do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$), desta forma, os valores observados neste estudo, bem próximos ao eixo 0, demonstram uma coloração acinzentada (HUNTERLAB, 1996; RIBEIRO, 2007), tal característica pode ser atribuída ao maior teor de lipídios presentes na carne, provenientes de fatores intrínsecos (sexo, idade) ou extrínsecos (meio de criação e alimentação) à biologia do pescado (SANTOS, 2013).

O processo de lavagem com água ozonizada não proporcionou mudanças na cor do filé de tilápia, o que indica a forma de tratamento com ozônio preserva a coloração de forma idêntica. O valor da coordenada a^* em produtos de origem animal está relacionado com a concentração dos pigmentos presentes de forma natural, adicionados ou produzidos durante o processamento (OLIVEIRA, 2009).

Resultados com valores próximos foram observado por Souza *et al.* (2005) quando se foi analisado o filé de tilápia *in natura*, apresentando valores de $a^* = -0,74$. Oliveira (2005) estudou a cor do filé de tilápia tratada com ozônio e observou o valor $a^* = 1,90$. Por sua vez, Vaz (2005) estudou a cor do surimi de tilápia e verificou um valor baixo de $a^* = 0,29$.

Oliveira (2009) afirma que normalmente são encontrados valores elevados desta coordenada nos tunídeos, pois esta família tem a característica de conter teores elevados de hemopigmentos, com exceção do bonito. Schubring (2010) estudou a imersão dos retalhos de “Minced fish” em peróxido de hidrogênio e o valor de a^* apresentou uma redução. Schubring

(2010) relatou uma redução do parâmetro a^* quando lavou a carne de sardinha picada com água e bicarbonato de sódio.

Para o parâmetro b^* , pode-se verificar na tabela 13 que no tratamento controle houve aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de 5 e 15 minutos de imersão, porém, no tempo de 10 minutos houve uma redução significativa. No tratamento com 0,5 ppm houve aumento significativo ($p < 0,05$) a partir do tempo de 5 minutos, mas aos 15 minutos de imersão houve uma redução nos valores do parâmetro a^* . No tratamento com 1,0 ppm houve um aumento significativo ($p < 0,05$) a partir dos 5 minutos de imersão, mas a partir dos 10 minutos houve redução nos valores de a^* . No tratamento com 1,5 ppm foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) aos 10 minutos de imersão.

Tabela 13: Parâmetro de cor “b” (Amarelo (+b) – Azul (-b)) nos filés de tilápia do Nilo lavadas com água ozonizada nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm durante 0; 5; 10 e 15 minutos de imersão.

Concentrações de ozônio (ppm)	Tempo (min)			
	0	5	10	15
0 (Controle)	$1,20 \pm 0,10^a$	$1,77 \pm 0,12^b$	$1,41 \pm 0,04^c$	$1,98 \pm 0,05^d$
0,5	$1,20 \pm 0,10^a$	$1,77 \pm 0,06^b$	$1,86 \pm 0,05^c$	$1,23 \pm 0,29^{ad}$
1,0	$1,20 \pm 0,10^a$	$2,21 \pm 0,06^b$	$1,84 \pm 0,06^c$	$1,54 \pm 0,09^d$
1,5	$1,20 \pm 0,10^a$	$1,34 \pm 0,03^a$	$1,67 \pm 0,09^b$	$1,62 \pm 0,18^{bc}$

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$), pelo teste de *t*-Student a 5% de probabilidade. Média \pm SD, n=3.

O parâmetro b^* não sofreu alteração durante o processo de lavagem com água ozonizada, pois tanto no tratamento controle (0 ppm) como no tratamento com água ozonizada houve aumento na intensidade da cor amarela podendo indicar ocorrência da oxidação lipídica, sendo um processo natural da carne.

Segundo Oliveira (2005), o teor de amarelo b^* avalia os pigmentos carotenoides depositado na gordura da carne. Este autor encontrou valores de $b^* = -1,71$ para filés de tilápia imersa no ozônio, o que pode ocorrer em virtude da diferença de quantidade ingerida de fitoplâncton existente nos tanques de terra, da capacidade individual de ingestão e conversão da ingesta em lipídios, favorecendo a diferença na quantidade de pigmentos que estão na gordura. Vaz (2005) cita ainda que a pigmentação indesejada no filé pode advir do uso excessivo de milho nas rações. Tais produtos são ricos em luteína e zeaxantina, carotenoides responsáveis também pela coloração amarelada.

Por sua vez, Souza *et al.* (2005) reportaram para o teor de amarelo, b^* , o valor de 10,17 ao analisarem a tilápia *in natura*. Schubring (2010) estudou a imersão dos retalhos de “Minced fish” em peróxido de hidrogênio e o valor de b^* apresentou uma redução. Schubring (2010) observou que o valor de b^* aumentou quando a sardinha picada foi lavada com água.

5.3.3 Teste do TBA

A variação dos valores de TBA do filé de tilápia do Nilo durante as imersões em água ozonizada foram ilustradas na Figura 11, e verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o TBA quando comparado ao tratamento controle. No tratamento com 0,5 ppm houve aumento significativo nos valores de TBA a partir dos 15 minutos de imersão. Nos tratamentos com 1,0 e 1,5 ppm houve aumento significativo a partir dos 5 minutos de imersão.

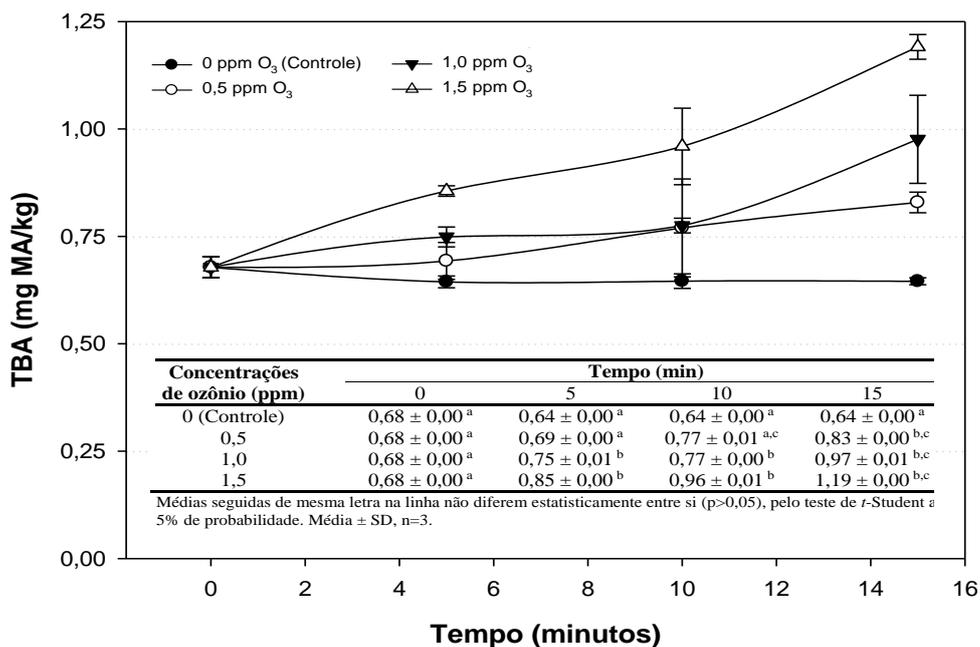


Figura 11. Variação de TBA nos filés de tilápia do Nilo imersas em água ozonizada (concentrações 0; 0,5; 1,0 e 1,5 ppm) durante 0; 5; 10 e 15 minutos.

Esses dados demonstram que a concentração e o tempo influenciaram nos resultados de TBA, diante disto, nota-se que a oxidação causada pelo ozônio é diretamente proporcional à sua concentração e o tempo de contato com as amostras, portanto, ao potencializar-se o efeito antimicrobiano do ozônio, reações de oxidação da cadeia lipídica podem ser

desencadeadas atingindo níveis inadequados de peróxidos para os padrões de qualidade estabelecidos pela literatura disponível.

Os valores de TBA observados para o filé de tilápia não ultrapassaram níveis acima de 2,0 mg de MA/kg, que segundo Crowe *et al.* (2012) está associado ao odor e sabor rançoso em peixes. Dessa forma, podemos inferir que a água ozonizada nas concentrações e tempos de contato avaliadas nesse estudo não promoveu oxidação lipídica que reduzisse a qualidade dos filés de tilápia. Como não há padrão para este parâmetro na legislação nacional, os resultados são comparados com dados disponíveis na literatura.

Louppis *et al.* (2011) trataram mexilhões com água ozonizada. Os valores para o TBA foram de 0,10 MA/kg (sem ozônio) e 0,21 MA/kg (com ozônio). Esses resultados podem ser explicados pela decomposição do ozônio em oxigênio o que favorece a oxidação dos lipídios em alimentos com predominância de lipídios insaturados, com formação de peróxidos e produtos oriundos de sua decomposição.

Tomita *et al.*, (2010) observaram que os valores de TBA do filé de tilápia aumentaram quando submetido ao tratamento com ozônio (2 ppm) durante 5 minutos e estocados por 6 dias. No primeiro dia verificou-se teores de TBA de 1,00 mg MA/kg e no sexto dia atingiu o valor de 1,99 mg MA/kg. No entanto pode-se dizer que a partir do sexto dia de estocagem as amostras já apresentavam um grau de oxidação lipídica muito elevado, ultrapassando o limite de aceitação.

Kim *et al.* (2000) trataram o filé de bagre (*Ictalurus punctatus*) com água ozonizada (10 ppm) e verificou-se que houve um aumento nos valores de TBA quando comparado com o tratamento controle, mas todos os valores de TBA foram abaixo de 0,12 mgMA/kg, diante disto, a vida de prateleira do filé aumentou em 25%.

Crowe *et al.* (2012) trataram o filé de salmão do atlântico com pulverização de ozônio (1,5 ppm) armazenados durante 10 dias. Os Valores de TBA aumentaram de forma constante a partir do dia 0 (0,35 mg MA/kg) até o 10 dia (1,74 mg MA/kg). O filé de salmão é susceptível a oxidação lipídica devido à quantidade de gordura. Estes valores estão abaixo de 2,0 mg MA/kg, portanto, a qualidade do filé não foi afetada pelo ranço lipídico

Dados da literatura relatam que não há aumento nos níveis de oxidação lipídica no pescado submetidos ao tratamento com ozônio. Manousaridis *et al.* (2005) trataram mexilhões embalados a vácuo e tratados com ozônio (1 e 1,5 ppm), verificou-se que apesar do ozônio ser um poderoso oxidante ocorreu uma redução nos níveis de oxidação lipídica encontrado no mexilhão *in natura* (sem ozônio 30-35 mg MA/kg; com ozônio 23-13 mg MA/kg). Segundo os autores, uma explicação possível para este fenômeno seria a de que o malonaldeído e outros produtos de oxidação também poderia ter oxidado, apresentando, desta maneira, um valor de TBA baixo. Campos *et al.* (2006) observaram que os valores de TBA para peixes armazenados durante 21 dias em gelo líquido ozonizado (40% de gelo e 60% de ozônio) apresentou menores valores quando comparado com amostras controle (40% de gelo e 60% de água destilada).

6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais, observou-se eficácia máxima na redução da carga microbiana durante a imersão da tilápia do Nilo inteira na concentração de 1,5 ppm e dos filés na concentração 1,0 ppm (5 minutos), comprovando o efeito antimicrobiano.

O ozônio não alterou a qualidade físico-química dos filés de tilápia do Nilo quanto aos parâmetros pH e Cor.

Observou-se o desencadeamento do processo oxidativo com o aumento da concentração de ozônio e do tempo de imersão

O custo do consumo de energia elétrica utilizada para geração do ozônio (1,5 ppm), para o volume de 170 litros, durante 1 hora foi em média de R\$ 0,40 demonstrando a viabilidade de se utilizar essa tecnologia.

Espera-se que os resultados deste estudo possam contribuir para a inserção da tecnologia do ozônio na indústria do pescado.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, E.M.C., SANTOS-PEDRO, D.M., BRANDÃO, T.R.S. & SILVA, C.L.M. Influence of aqueous ozone, blanching and combined treatments on microbial load of red bell peppers, strawberries and watercress. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 277-282, 2011.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.
- ALVES, G; ZABINE, L; BANTLE, J. F; RODRIGUES, L. C. S; PASQUALI, R; NASCIMENTO, I. A. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) inteiras evisceradas submetidas a salga e secagem natural **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 13, n. 2, p. 71-75, jul./dez. 2010.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). Standard methods for examination of water and wastewater. 4500-O3 – Ozone (Residual), p. 144 –146. 19th Ed., Washington DC, 1995
- BATALLER, M.O.; FERNÁNDEZ, L.A. & VÉLIZ, E. Eficiencia y sostenibilidad del empleo del ozono en la gestión de los recursos hídricos. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 26, n. 1, p. 85-95, 2010.
- BERTOLIN, T. E.; GUARIENTI.; C. FARIAS, D.; SOUZA, F. T.; GUTKOSKI, L. C.; COLLA, L. M. Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 35, n.4, p. 751 - 757, 2011.
- BLOGOSLAWSKI, W. J. & STEWART, M. E. Some Ozone Applications in Seafood. **Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association**, v.33, n.5, p.368-373, 2011.
- BOMBARDELLI; R.A.; SYPERRECK, M.A. & SANCHES, E.A. Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. **Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR**, 8(2): p. 181-195, 2005.

BONO, G. & BADALUCCO, C. Combining ozone and modified atmosphere packaging (MAP) to maximize shelf-life and quality of striped red mullet (*Mullus surmuletus*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 47, p.500-504, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei n. 30.691, de 29 de março de 1952. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução: RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001**. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de jan. 2001.

BRITO, J. M., FERREIRA, A. H. C., JÚNIOR, H. A. S., ARARIPE, M. N. B. A., LOPES, J. B., DUARTE, A. R., JÚNIOR, M. A. B., SILVA, A. L. Policultivo de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) em tanques-rede-revisão. **Revista Eletrônica Nutrime**, v. 11, n. 2, p. 3225-3237, 2014.

BROOKS, G.M. & PIERCE, S.W. 1990. Ozone applications for commercial catfish processing. Paper presented at 15th Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas, December 2-5, Orlando, Florida, 1990. Retrieved September 25, 2008, from http://sst.ifas.ufl.edu/AnnPdf/15th_180.pdf

CAMPOS, C.A., LOSADA, V., RODRÍGUEZ, O., AUBOURG, S.P. & BARROS-VELAZQUEZ, J. Evaluation of ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). **Food Chemistry**, v.97, n. 2, p. 223-230, 2006.

CAMPOS, C.A., RODRIGUEZ, O., LOSADA, V., AUBOURG, S.P. & BARROS-VELAZQUEZ, J. Effects of storage in ozonized slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 121-130, 2005.

CARDOSO, C.C., VEIGA, S.M.O.M., NASCIMENTO, L.C., FIORINI, J.E. & AMARAL, L.A. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 59-61, 2003.

CARVALHO FILHO, D.U. **Avaliação da qualidade de fishburger de tilápia (*Oreochromis sp*) em diferentes concentrações de farinha de trigo**. 25f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

CHAWLA, A.S. **Application of ozonated water technology for improving quality and safety of peeled shrimp meat**. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Índia: Gujarat Agricultural Univeristy, Louisiana State University, 2006.

CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 341-349, 2008.

CORREIA, A. P.; ALVES, A. R.; LOPES, J. P.; SANTOS, F. L. B. Reversão sexual em larvas de tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus*, (LINNAEUS, 1758) em diferentes condições ambientais. **Rev. Bras. Eng. Pesca**, v. 1, n. 1, p.54 – 64, 2006.

COSTA, A. R. **Ozônio como agente fungicida na pós-colheita do mamão (*Caricapapaya L.*)**. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

CROWE, K.M.; SKONBERG, D.; BUSHWAY, A.; BAXTER, S. Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. **Food Control**, v.25, n. 2, p. 464-468, 2012.

DAMASCENO, A. **Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte – MG**. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

DEW, T.S. **Ozone degradation of off-flavors in catfish**. 2005. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - University of Lousiana, 2005.

DÓRIA, A. A. C. **Segurança alimentar de tainhas *Mugli curema* (Mugiliformes: Mugilidae) do estuário do rio Vaza-Barris, Sergipe: aspectos sanitários e nutricionais**. 64f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2012.

- FARIAS, M. C. A. & FREITAS, J. A. Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paraenses. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p.113-117, 2008.
- FLICK. G. J. J. Ozone: Sanitizer, disinfectant for seafood processing. *Global Aquaculture Advocate.*, 2004
- FOGAÇA, F. H. S. & SANT'ANA, L. S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 2, p. 117 – 127, 2009.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- GELMAN, A., SACHS, O.; KHANIN, Y., DRABKIN, V.; GLATMAN, L. Effect of ozone pretreatment on fish storage life at low temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 778-784, 2005.
- GOMES, L. M. **Influência das condições de manuseio e conservação na qualidade do pescado**. 43f. Monografia (Especialização em Higiene, Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal – Instituto Qualittas de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, São Paulo, 2006.
- GONÇALVES, A. A. & KECHINSKI, C. P. Ozone Technology in the Food Industry. In: SIEGLER, B. C. *Food Engineering*. New York. Ed: Nova Science Pub, 2011, cap. 2, p.85-146.
- GONÇALVES, A. A., SOARES, L. A. SOUZA. Efeitos do processamento e armazenamento na fração lipídica do pescado. **Vetor**, Rio Grande do Sul, v. 10, p. 93-112, 2000.
- GONÇALVES, A.A. & PAIVA, F.G. El ozono como agente antiséptico en la industria pesquera. **Infopesca Internacional**, v. 31, n. 1, p.345-367, 2004.
- GONÇALVES, A.A. (2011). Processos Oxidativos Avançados (Ozônio), In: Gonçalves, A.A. (Ed.). **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação** (pp.500-512). São Paulo: Ed. Atheneu.
- GONÇALVES, A.A. Ozone – an emerging technology for the seafood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1527-1539, 2009.

GONÇALVES, R. F. **Desinfecção de efluentes sanitários**. Rio de Janeiro: ABES, RIMA 438 p.: il. Projeto PROSAB, 2003.

GRAHAM, D. M. Ozone as an antimicrobial agent for the treatment, storage and processing of foods in gas and aqueous phases. Direct Food Additive Petition, The Electric Power Research Institute (EPRI), Palo Alto, CA, 380f, 2000.

GUERRA, L. M. V. H. S. **Efeitos da embalagem em ar, sob vácuo e atmosfera modificada sobre a qualidade de filetes de peixe-porco *Balistes capriscus***. 77f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade do Algarve, Faro, 2013.

HANSEN, J. K. **Application of ozone as a disinfectant for commercially processed seafood**. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Oregon State University, Oregon, 2002.

HUNTERLAB. Applications note: CIE L* a* b* color scale. Virginia, 1996. v. 8, n. 7.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008. 1000 p.

JÚNIOR, C. A. F. & JÚNIOR, A. S. V. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural, XLVI, 2008, Rio Branco.

KASIVISWANATHAN, M.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Ozone utilization. In Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering, Second Edition. Taylor and Francis: New York, Published online: 28 sep 2010; 1177-1180.

KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 45-54, 2001.

KIM, J. G. Environmental Friendly Sanitation to Improve Quality and Microbial Safety of Fresh-Cut Vegetables. Biotechnology – Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life, Prof. Reda Sammour (Ed), Chap 11, p. 173-196, 2012.

KIM, T.J.; SILVA, J.L.; CHAMUL, R.S.; CHEN, T.C. Influence of ozone, hydrogen peroxide, or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish fillets. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1210-1213, 2000.

LIMA, C. L. S. **Avaliação dos perigos microbiológicos em uma indústria de beneficiamento de pescado e sugestão de um sistema de gestão de qualidade**. 128f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

LOUPPIS, A. P.; KATIKOU, P.; GEORGANTELIS, D.; BADEKA, A. V.; KONTOMINAS, M. G. Effect of ozonation and γ -irradiation on post-harvest decontamination of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) containing diarrhetic shellfish toxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 12, p. 1735-1744, 2011.

MAHMOUD, A. & FREIRE, R.S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 198-205, 2007.

MAIA, E. L.; OGAWA, M. COR. In: **Manual de pesca (Ciência e tecnologia do pescado)**. OGAWA, M.; MAIA, E. L. (Ed.) São paulo: Livraria Varela, cap. 5, p.75-85, 1999

MAIRS, P.; NASH, B.; BLAKISTONE, B.; YUAN, J.; BOLTON, G. **Evaluation of ozone as a disinfectant agent to enhance the quality and extended the shelf life of raw, vacuum-packed fish**. 1999. 37f. Project North Carolina Fishery Resource Grant Program (FRG 99-ST-04).

MANOUSARIDIS, G.; NERANTZAKI, A.; PALEOLOGOS, E. K.; TSIOTSIAS, A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS M. G. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. **Food Microbiology**, v. 22, p. 1-9, 2005.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura Brasil 2010. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%A4Dstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 31 out. 2014. Brasília: MPA, 2012.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasil 2008-2009. MPA, 2011.

MONDARDO, R.I.; SENZ, M.L.; MELO FILHO, L.C. Pré-tratamento com cloro e ozônio para remoção de cianobactérias. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.11, n. 4, p. 337-342, 2006.

MONTEIRO, M. L. G. **Aproveitamento de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de novos produtos com valor agregado**. 178f. Tese (Doutorando em

Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

MONTEIRO, M. L. G. **Validade comercial de filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) resfriados tratados com irradiação e embalados em atmosfera modificada.** 142f. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e processamento tecnologico de produtos de origem animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

OLIVEIRA, N. M. S. **Ação sanificante do dicloroisocianurato de sódio, ozônio e ultrassom em filés de tilápia (*oreochromis niloticus*.** 156f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade federal de Lavras, Lavras, 2005.

OLIVEIRA, N.M. S.; OLIVEIRA, W.R.; NASCIMENTO, L.C.; SILVA, J.M.S.F.; VICENTE, E.; FIORINI, J.E.; BRESSAN, M.C. Avaliação físico-química de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) submetidos à sanitização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p.83-89, 2008.

OLIVEIRA, R. B. A. **Qualidade de atuns tipo exportação capturados no litoral de Pernambuco e Rio Grande do Norte, Brasil.** 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, 655-663, 2005.

PASTORIZA, L.; BERNÁRDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; CABO, M.L.; HERRERA, J.J.R.. The use of water and ice with bactericide to prevent on board and onshore spoilage of refrigerated megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis*). **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 31-38, 2008a.

PASTORIZA, L.; BERNÁRDEZ, M.; SAMPEDRO, G.; CABO, M.L.; HERRERA, J.J.R. Use of sterile and ozonized water as a strategy to stabilize the quality of stored refrigerated fresh fish. **Food Control**, v.9, n. 8, p. 772-780, 2008b.

PATIL, S. **Efficacy of Ozone and Ultrasound for Microbial Reduction in Fruit Juice.** 274 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Dublin Institute of Technology, Irlanda, 2010

PEREIRA, A. A. F. & TENUTA-FILHO, A. Avaliação de condições de consumo da sardinha. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas v. 25, n. 4, p. 720 - 725, 2005.

PESTANA, C. M. P. **Conservação de filetes de sardinha, *Sardina pilchardus*, sujeitos a estabilização com gás solúvel (SGS), embalados em ar, vácuo e atmosfera modificada.** 83 f. Dissertação (Mestre em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

PEZZI, E. **O uso do ozônio como sanitizante em pós-colheita de produtos agrícolas.** 37f. Monografia (Especialista em Fitossanidade) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RAVESI, E.M.; LICCIARDELLO, J. J.; RACICOT, L.D. Ozone treatments of fresh Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Marine Fisheries Review**, v.49, n. 4, p. 37-42, 1987.

RIBEIRO, A. L. M. S.; OLIVEIRA, G. M.; FERREIRA, V. M.; PEREIRA, M. M. D.; SILVA, P. P. O. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 16, n. 3, p. 109 – 112, 2009.

RIBEIRO, S. C. A.; RIBEIRO, C. F. A.; KIL JIN PARK.; ARAUJO, E. A. F.; SATOSHI TOINAGA. Alteração da cor da carne de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) desidratada osmoticamente e seca. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.9, n. 2, p. 125 – 135, 2007.

RICE, R. P.; GRAHAM, M.; LOWE, M. T. Recent ozone applications in food processing and sanitation. Disponível em:< <http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/octobernovember-2002/recent-ozone-applications-in-food-processing-and-sanitation/>>. Acesso 29 de outubro de 2014.

RODRIGUES, B. L.; SANTOS, L. R.; MÁRSICO, E. T.; CAMARINHA, C. C.; MANO, S. B.; JUNIOR, C. A. C. Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, set./out. 2012

RONG, C.; BANG-ZHONG, Y.; QI, L.; LAN-LAN, Z. Combined effect of ozonated water and chitosan on the shelf-life of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Innov. Fd. Sci. and Emerg. Tech**, v.11, n.1, p. 108–112, 2010.

SANTOS, A. P. B.; KUSHIDA, M. M.; LAPA-GUIMARÃES, J. Avaliação da qualidade de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada resfriada utilizando o método do índice de qualidade (MIQ), análises químicas e microbiológicas. **B.Ceppa**, Curitiba, v. 32, n. 2, p. 177-190, jul./dez. 2014.

SANTOS, E. C. B. **Métodos de abate e qualidade da tilápia do Nilo**. 100f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SANTOS, E. L.; WINTERLE, W. M. C.; LUDKE, M. C. M. M.; BARBOSA, J. M. Digestibilidade de ingredientes alternativos para Tilápiap-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): **Revisão. Rev. Bras. Eng. Pesca**, v. 3, n. 2. P. 135 – 149, 2008a.

SCHNEIDER, K. R.; STESLOW, F. S.; SIERRA, F. S.; RODRICK, G. E.; NOSS, C. I. Ozone depuration of *Vibrio vulnificus* from the Southern Quahog Clam, *Mercenaria campechiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 184-190, 1991.

SCHUBRING, R. (2010). Quality assessment of fish and fishery products by color measure In: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis**. Boca Raton: Ed. CRC Press, cap. 22, p. 395-424.

SILVA, A. M. M. & GONÇALVES, A. A. Potencialidade do uso de água ozonizada no processamento de peixes. **Actapesca**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2014.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M.C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

SILVEIRA, G. R. **Prazo de validade de tilápias (*Oreochromis niloticus*) mantidas sob refrigeração em diferentes períodos de estocagem**. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2013.

SIMÕES, M. R.; RIBEIRO, C. F. A.; RIBEIRO, S. C. A.; PARK, K.J.; MURR, F. E. X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.3, p.608-613, 2007.

SOARES, K. M. P. & GONÇALVES, A. A.; Qualidade e segurança do pescado. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v.71, n.1, p.1-10, 2012.

SOARES, K. M. P. **Método do índice de qualidade (MIQ) na estimativa da vida útil da tilápia do nilo (*oreochromis niloticus*), nas formas inteira, eviscerada e em filé, armazenada em gelo**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2012.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A.; SOUZA, L. B.; Qualidade microbiológica de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o armazenamento em gelo. **Ciência Rural, Santa Maria, Online**. Disponível em: < <http://coral.ufsm.br/ccrrevista/artigos/CR-2013-1065.R2.pdf> > Acesso em: 05 de nov. de 2014.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A.; SOUZA, L. B.; SILVA, J. B. A. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) armazenada em gelo. **Acta Veterinária Brasilica**, v.6, n.3, p.239-242, 2012.

SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; IZIDORO, T. B.; MARTINS, O. A.; PINTO, J. P. A. N.; BIONDI, G. F. Qualidade microbiológica de filés de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu –SP. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 2, p. 85-8, 2011.

SOUZA, C. L.; FREITAS, J. A.; LOURENÇO, L. F. H.; ARAUJO, E. A. F.; SOUZA, J. N. S. Avaliação da qualidade microbiológica no processamento de pescados. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 70, n.2, p. 151-7, 2011.

SOUZA, M. L. R.; VIEGAS, E. M. M.; SOBRAL, P. J. A.; KRONKA, S. N. Efeito do peso de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o rendimento e a qualidade de seus filés defumados com pele e sem pele. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.1, p. 51-59, jan/mar. 2005.

SUMMERFELT, S.T. & HOCHHEIMER, J.N. Review of Ozone Processes and Applications as an Oxidizing Agent in Aquaculture. **The Progressive Fish-Culturist**, v.59, n. 2, p. 94-105, 1997.

SUSLOW, T.V. Basics of ozone applications for postharvest treatment of fresh produce. **Perishables Handling**, v.94, p. 9-11, 2003.

TARLADGIS, B.G.; WATTS, B.M.; YOUNATHAN, M.T. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 37: 44-48, 1960.

TEIXEIRA, A. R. G. **Avaliação da qualidade e segurança alimentar de carapau (*Trachurus trachurus*) descarregado na Lota de Peniche. Influência e características gerais da água de lavagem no pescado descarregado**. 76f. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche, 2012.

TERRA, N.N. & BRUM, M.A.R. **Carnes e seus derivados. Técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 120 p.1998.

TIWARI, B.K. & RICE, R.G. Regulatory and Legislative Issues. In: O'donnel, C., Tiwari, B. K., Cullen, P. J. & Rice, R. G., **Ozone in food processing**. Blackwell Publishing Ltd., pp.7-17, 2012.

TOMITA, R. Y.; FURLAN, E. F.; NEIVA, C. R. P.; NETO, M. J. L.; MACHADO, T. H. Utilização do ozônio como agente sanitizante no processamento do pescado. In: 16ª Reunión de la Red Panamericana de Inspección, Control de Calidad y Tecnología de productos Pesqueros - IV Simpósio de Controle de Qualidade do pescado (SIMCOPE), Parte III - Los procesos y productos pesqueros innovadores en la Región. Santos, 20 a 24 de setiembre de 2010, p. 1-14

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (1999). Wastewater Technology Fact Sheet Ozone Disinfection. 832-F-99-063.

VALLANDRO, M. J. **Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porvazo Alegre – RS**. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

VAZ, S. K. **Elaboração e caracterização de linguça fresca “tipo toscana” de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2005.

VAZ-VELHO, M.; SILVA, M.; PESSOA, J.; GIBBS, P. Inactivation by ozone of *Listeria innocua* on salmon trout during cold-smoke processing. **Food Control**, v.17, n. 1, p. 609-616, 2006.

VIDAL, J. M. A. **Utilização de resíduos da filetagem de Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) na obtenção de concentrado protéico de peixe: caracterização físico-química e aceitação sensorial.** 110f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

VIEGAS, E. M. M.; PIMENTA, F. A.; PREVIERO, T. C.; GONÇAVES, L. U.; DURÃES, J. P.; RIBEIRO, M. A. R.; OLIVEIRA FILHO, P. R. C. Métodos de abate e qualidade da carne de peixe. **Archivos de Zootecnia.**, v. 61, p. 41 – 50, 2012.

VIEIRA, J. P. F.; BRESSAN, M. C.; OLIVEIRA, N. M. S.; ANDRADE, P. L.; TAVARES, S. A. Perfil de ácidos graxos em files de tilápia (*Oreochromis niloticus*) submetidos a tratamentos de sanificação. Congresso de dos Pós-Graduandos da UFLA, Lavras, p.55-58, 2004.

WYSOK, B.; URADZIŃSKI, J.; GOMÓ KA-PAWLICKA, M. Ozone as an alternative disinfectant – **Rev. Pol. J. Fd. Nutr. Sci.**, v.15/56, n. 1, p. 3–8, 2006.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. **Food Technology**, v.53, n. 10, p. 58-62, 1999.

ZANOLO, R. & YAMAMURA, M. H. Parasitas em tilápias-do-nilo criadas em sistema de tanques-rede. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 281-288, abr./jun. 2006.

ZHANG, L.; ZHAOXIN, L.; ZHIFANG, Y.; XIANG, G. Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water. **Food Control**, v.16, n. 1, p. 279-283, 2005.

ANEXO A

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA)

1. PRINCÍPIO

O teste do ácido 2-tioarbitúrico (TBA) trata-se de um teste baseado na reação do ácido tioarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA). Neste ensaio uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor rosa (PESTANA, 2007). O qual absorve 532 nm de comprimento de onda (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm) (OSAWA *et al.*, 2005).

2. REAGENTES E SOLUÇÕES

- Solução aquosa de TCA 7,5%, contendo 0,1% de EDTA e 0,1% de propilgalato;
- Solução aquosa de TBA 0,02 M (2,883 g TB/vA em 1000 ml H₂O)
- Reagente TMP padrão: 1,1,3,3-tetrametoxipropano [malonaldehyde bis(dimethyl acetal)], grau de pureza 99% (C₇H₁₆O₄; FW = 164, 2g; d = 0,997 g/ml);
- Solução estoque de TMP (4,85 x 10⁻³M)-(0,08 ml TMP em 100 ml TCA 7,5%);
- Solução trabalho de TMP (4,85 x 10⁻⁵M)-(0,1 ml SE-TMP em 100 ml TCA 7,5%)..

3. CURVA PADRÃO

Colocar quantitativamente as seguintes alíquotas de TMP, dentro de tubo de ensaio com tampa:

Tubo	TMP (4,85X10 ⁻⁸ moles/ml)	TCA 7,5%	Concentração (x 10 ⁻⁸ moles/5ml)
0	0	5,0	0
1	0,5	4,5	2,425x10 ⁻⁵
2	0,7	4,3	3,395x10 ⁻⁵
3	1,0	4,0	4,850x10 ⁻⁵
4	1,2	3,8	5,820x10 ⁻⁵
5	1,5	3,5	7,275x10 ⁻⁵
6	2,0	3,0	9,700x10 ⁻⁵

- adicionar em cada tubo, 5 ml da solução de TBA;
- fechar a tampa e aquecer em banho-maria fervente por 40 minutos;
- resfriar imediatamente sob água corrente (10 minutos);
- caso haja turbidez em alguns tubos, proceder uma centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos (por conveniência, centrifugar todos os tubos);
- fazer a leitura a 538 nm.

Obs.: Não esquecer de efetuar a prova em branco (ler no espectrofotômetro contra o branco).

4. TESTE DE RECUPERAÇÃO

As três etapas seguintes devem ser realizadas no mesmo tempo:

a) Absorbância (A) do extrato muscular:

- pesar 10 g de músculo e adicionar 50 ml de TCA 7,5%;
- homogeneizar por 1 min;
- filtrar em papel filtro e algodão;
- retirar uma alíquota de 5 ml do extrato e colocar dentro de tubo de ensaio com tampa;
- adicionar ao tubo, 5 ml da solução de TBA 0,02M;
- fechar a tampa e aquecer em banho-maria fervente por 40 min;
- resfriar imediatamente sob água corrente (10 min);
- caso haja turbidez em alguns tubos, proceder uma centrifugação a 2000 rpm por 5min;
- fazer a leitura a 538 nm.

b) Absorbância (B) da solução de TMP:

- dentro de um tubo de ensaio 1 ml da solução trabalho TMP e 4 ml TCA 7,5%;
- adicionar ao tubo, 5 ml da solução de TBA 0,02M;
- fechar a tampa e aquecer em banho-maria fervente por 40 min;
- resfriar imediatamente sob água corrente (10 min);
- caso haja turbidez em alguns tubos, proceder uma centrifugação a 2000 rpm por 5min;
- fazer a leitura a 538 nm.

c) Absorbância (C) do extrato muscular mais TMP:

- pesar 10 g de músculo, adicionar 10 ml solução trabalho TMP e 40 ml TCA 7,5%;
- homogeneizar por 1 minuto;
- filtrar em papel filtro e algodão;
- retirar uma alíquota de 5 ml do extrato e colocar dentro de tubo de ensaio com tampa;
- adicionar ao tubo, 5 ml da solução de TBA 0,02M;
- fechar a tampa e aquecer em banho-maria fervente por 40 minutos;
- resfriar imediatamente sob água corrente (10 minutos);
- caso haja turbidez em alguns tubos, proceder uma centrifugação a 2000 rpm por 5 min;
- fazer a leitura a 538 nm.

d) Cálculo da recuperação do malonaldeído adicionado ao músculo (R):

$$R = \frac{(C)}{(A) + (B)} \times 100$$

e) Valor de K:

$$K = \frac{1}{d} * p.mol * \frac{10^7}{\text{peso amostra (g)}} + \frac{100}{R}$$

onde:

d = declividade da curva padrão

p.mol.= peso molecular malonaldeído (72 g/ml)

R = % recuperação

f) Número de TBA (mg MA/Kg amostra): $N^{\circ} \text{ TBA} = \text{D.O.} \times K$

ANEXO B

PROTOCOLO DE MENSURAÇÃO DO OZÔNIO NA FASE LÍQUIDA – MÉTODO COLORIMÉTRICO ÍNDIGO

Aparelho: Espectrofotômetro com filtro para utilização em 600 ± 10 nm.

Reagentes:

- a. Solução estoque Índigo: Adicionar cerca de 500 ml de água destilada e 1 mL de ácido fosfórico concentrado a um balão volumétrico de 1 litro. Com agitação, adicionar 770 mg trissulfonato indigo de potássio, $C_{16}H_7N_2O_{11}S_3K_3$ (use apenas reagente de alta qualidade, disponível no mercado em cerca de 80 a 85% de pureza). Preencha até a marca com água destilada. A diluição 1:100 exibe uma absorvância de $0,20 \pm 0,010$ cm a 600 nm. A solução estoque é estável durante cerca de 4 meses, quando armazenadas no escuro. Descartar quando a absorvância de uma diluição de 1:100 cai abaixo 0.16/cm. Não mude a concentração do corante para faixas mais elevadas de ozônio residual. Volume de corante utilizado pode ser ajustado.
- b. Reagente Índigo I: A um balão volumétrico de 1 L adiciona-se 20 mL de solução de estoque de índigo, 10 g de di-hidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), e 7 mL de ácido fosfórico concentrado. Diluir até a marca do balão. Preparar solução fresca quando a sua absorvância diminui para menos de 80% do seu valor inicial, tipicamente dentro de uma semana.
- c. Índigo reagente II: Proceder como com o reagente índigo I, mas adicionar 100 mL de solução estoque índigo em vez de 20 mL.
- d. Reagente ácido Malônico: Dissolver 5 g de ácido malônico em água destilada e diluir para 100 mL.
- e. Reagente Glicina: Dissolva 7 g de glicina em água destilada e diluir para 100 mL.

Procedimento Volumétrico

- 1) Faixa de Concentração 0,01 a 0,1 mg O_3/L : Adicionar 10 mL de reagente índigo I para cada um dos dois balões volumétricos de 100 mL. Encha um balão (branco) até a marca com água destilada. Encha o outro balão até a marca com a amostra. Medir a absorvância de ambas as soluções a 600 ± 10 nm, o mais rapidamente possível (pelo menos, dentro de 4 h). De preferência, usar células de 10 cm. Calcula-se a concentração de ozônio a partir da diferença entre as absorvâncias das amostras e o branco (NOTA: Um atraso máximo de 4 h antes da leitura espectrofotométrica pode ser tolerada apenas para amostras de água potável. Para outros tipos de amostras que não podem ser lidas imediatamente, determinar a relação entre o tempo e a absorção.)
- 2) Faixa de 0,05 a 0,5 mg O_3/L : Proceda como acima utilizando 10,0 mL do reagente indigo II em vez de reagente I. De preferência, medir a absorvância em células de 4 ou 5 cm.

3) Concentrações superiores a 0,3 mg O₃/L: Prossiga usando o reagente índigo II, mas para estas altas concentrações de ozônio usar um volume de amostra proporcionalmente menor. Dilui-se a mistura resultante a 100 ml com água destilada.

4) Controle de interferências: Na presença de baixa concentração de cloro (0,1 mg/L), coloque 1 mL de solução de ácido malônico em ambos os balões antes de adicionar amostra e/ou completar até a marca. Medir a absorvância tão breve quanto possível, dentro de 60 min (Br , Br₂ e HOBr são apenas parcialmente mascarados pelo ácido malônico).

Na presença de manganês preparar uma solução em branco utilizando amostra, em que o ozônio é destruído seletivamente pela adição de glicina. Coloque 0,1 mL de reagente de glicina num balão volumétrico de 100 mL (branco) e 10,0 mL reagente índigo II no segundo balão (amostra). Pipetar exatamente o mesmo volume de amostra em cada balão. Ajustar a dose para que a descoloração no segundo balão seja facilmente visível, mas não deixe que ocorra o branqueamento completo (máximo 80 mL).

Garanta que o pH da mistura de glicina/amostra no balão branco (antes de adicionar o índigo) não seja inferior a 6, pois a reação entre ozônio e glicina se torna muito lenta em pH baixo. Tampe os balões e misture cuidadosamente invertendo. Adicionar 10,0 mL do reagente índigo II no balão apenas 30 a 60s após a adição da amostra. Preencha ambos os balões até à marca com água livre de ozônio e misture bem. Medir a absorvância de ambas as soluções em períodos de contato comparáveis de aproximadamente 30 a 60 min (após este tempo, o óxido de manganês residual descolore mais o reagente índigo lentamente). Absorção reduzida no branco resulta de óxidos de manganês, enquanto que no frasco da amostra é devido ao ozônio mais óxido de manganês.

5) Calibração: pelo fato do ozônio ser instável, as medições iniciais são conhecidas e ocorre constante perda de absorção do reagente índigo ($f = 0,42 + 0.01/\text{cm}/\text{mg O}_3/\text{L}$). Para obter a precisão máxima da análise, o lote de trissulfonato índigo de potássio (nenhum lote comercial tem sido encontrado para desviar-se de $f = 0,42$) utilizando o procedimento iodométrico. Ao usar um fotômetro de filtro, reajustar o fator de conversão, f, comparando a sensibilidade do fotômetro com absorvância a 600 nm por um espectrofotômetro preciso.

Cálculo:

$$\text{mg O}_3/\text{L} = \frac{100 * \Delta A}{f * b * V}$$

onde:

ΔA : diferença de absorção entre a amostra e o branco

B: comprimento do caminho da célula (cm)

V: volume de amostra, mL (normalmente 90 mL)

F: 0,42

O fator f baseia-se num fator de sensibilidade de 20 000/cm para a mudança de absorvância (600 nm) por mole de ozônio adicionado por litro. Foi calibrado por titulação iodométrica. A absorção de UV de ozônio em água pura pode servir como um padrão secundário: o fator f 0,42 corresponde a um coeficiente de absorção para o ozônio aquoso, E 2950/M cm a 258 nm.